

---

# Analyse von Atmungskettenkomplexen aus Organellen von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Rattus norvegicus*

Vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
genehmigte

## Dissertation

von  
Dipl.- Biol. Helena Julia Schwaßmann  
aus  
Hilden

Berichterstatter:	Prof. Dr. N.A. Dencher
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Thiel
Tag der Einreichung:	22. 02. 2010
Tag der mündlichen Prüfung:	07. 05. 2010

Darmstadt 2010

D 17

---

Für Alex, Nina und XY

---

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2004 bis Juni 2007 und von November 2008 bis Februar 2010 (Unterbrechung wegen Elternzeit) unter der Leitung von Herrn Professor Dr. N. A. Dencher in der Abteilung für Physikalische Biochemie des Clemens-Schöpf-Instituts für Organische Chemie und Biochemie an der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

---

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

- Sascha Rexroth, Jürgen M. W. zu Tittingdorf, Helena Schwaßmann, Holger Seelert, Norbert A. Dencher (2004). „*Dimeric  $H^+$ -ATP-Synthase in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii*“ BBA Bioenergetics 1658: 202-211
- Helena Schwaßmann, Sascha Rexroth, Holger Seelert, Norbert A. Dencher (2007). „*Metabolism controls dimerization of the chloroplast  $F_0F_1$  ATP-Synthase in Chlamydomonas reinhardtii*“ FEBS Letters 581: 1391-1396
- H. Seelert, D.N. Dani, S. Dante, T. Hauß, F. Krause, E. Schäfer, M. Frenzel, A. Poetsch, S. Rexroth, H.J. Schwaßmann, T. Suhai, J. Vonck and N.A. Dencher (2009). „*From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: Structure–dynamics–function relationships of energy-transducing membranes*“ BBA Bioenergetics 1787: 657-671
- Helena Schwaßmann, Eva R. Schäfer, Holger Seelert, Norbert A. Dencher (2010). „*Respiratory Chain Supercomplexes in Chlamydomonas reinhardtii*“ (Veröffentlichung in Vorbereitung)

---

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. N. A. Dencher danke ich für die Aufnahmen in seine Arbeitsgruppe und für seine Unterstützung während der Promotion.

Herrn Prof. Dr. G. Thiel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Eva R. Schäfer, Stefan Schmelz, Sandra Thilmany, Jennifer Braun und Sebastian Ahrens danke ich für ihre hilfreiche und effektive Mitarbeit und ihre Beiträge zu dieser Arbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten und Praktika.

Meinem Mann Alexander danke ich für seine engagierte Hilfe bei der Vereinbarung von Kinderbetreuung und Doktorarbeit und meiner Tochter Nina dafür, dass sie so oft auf mich verzichtet hat.

Christine Schröpfer danke ich für die Bereitstellung diverser Puffer, kleiner Gele, und dafür, dass das Labor niemals völlig im Chaos versunken ist.

Meinen Eltern danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der gesamten AG Dencher sowie den ehemaligen Doktoranden Nicole, Sascha, Eva 1, Jürgen und Bettina möchte ich herzlich dafür danken, dass unsere gemeinsame Arbeitszeit eine schöne war.

---

<b>ANALYSE VON ATMUNGSKETTENKOMPLEXEN AUS ORGANELLEN VON <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> UND <i>RATTUS NORVEGICUS</i></b>	<b>1</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
2.1 Proteinkomplexe der Atmungskette	11
2.1.1 Die F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-Synthase	14
2.2 Quantitative Proteomanalyse	15
2.2.1 Densitometrische Methoden	17
2.2.2 Massenspektrometrische Methoden	20
2.2.3 Immunologische Methoden	23
2.2.4 Normierung	24
2.3 Massenspektrometrie in der Proteomanalytik	26
<b>3 ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>30</b>
<b>4 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>32</b>
4.1 Geräte und Computersoftware	32
4.2 Verbrauchsmaterial	33
4.3 Chemikalien	34
4.4 Anzucht und Haltung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> -Kulturen	37
4.5 Präparation von Chloroplasten und Mitochondrien aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	39
4.6 Präparation von Mitochondrien aus dem Gehirn von <i>Rattus norvegicus</i>	40
4.7 Native Solubilisierung der Proteine	42
4.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
4.8.1 Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
4.8.2 2D-BN/SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
4.8.3 2D BN/BN PAGE	52
4.8.4 Glycin-SDS PAGE	52

---

---

<b>4.9</b>	<b>In-Gel Aktivitätstests</b>	<b>53</b>
4.9.1	NADH Dehydrogenase Aktivität von Komplex I	53
4.9.2	Cytochrom-c Oxidase Aktivität von Komplex IV	54
4.9.3	ATPase Aktivität von Komplex V	55
<b>4.10</b>	<b>In-Gel Proteinfärbungen</b>	<b>57</b>
4.10.1	Coomassie Färbung nach Görg	57
4.10.2	Roti® Blue Färbung	58
4.10.3	Silbernitrat Färbung	58
4.10.4	SYPRO® Ruby Färbung	59
4.10.5	Pro-Q® Diamond Färbung	60
<b>4.11</b>	<b>Westernblots und Antikörpermarkierung</b>	<b>61</b>
4.11.1	Semi-Dry Blotting	62
4.11.2	Antikörpermarkierung	63
4.11.3	Chemolumineszenz-Detektion	65
4.11.4	Färbung mit Reactive Brown	65
<b>4.12</b>	<b>Elektroelution</b>	<b>66</b>
<b>4.13</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b>	<b>67</b>
<b>4.14</b>	<b>Weitere analytische Methoden</b>	<b>68</b>
4.14.1	Bestimmung der Zellzahl	68
4.14.2	Bestimmung des Proteingehalts mit Roti®-Nanoquant	68
4.14.3	Bestimmung des Chlorophyllgehalts	69
<b>4.15</b>	<b>MALDI-Massenspektrometrie</b>	<b>70</b>
4.15.1	Massenspektrometrie von ganzen Proteinen	71
4.15.2	Massenspektrometrie von Mikroproteinen	74
4.15.3	Peptide Mass Fingerprinting	75
4.15.4	Isotopenmarkierung	80
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>Dimerisierung von Chloroplasten-ATP-Synthase in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ist abhängig vom metabolischen Zustand der Zellen</b>	<b>81</b>
5.1.1	Untersuchungen der Chloroplasten-ATP-Synthase Dimere durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	83
5.1.2	Metabolische <i>in vivo</i> Markierung der Algen mit <sup>14</sup> N und <sup>15</sup> N	87

---

---

5.1.3	Experimente zur massenspektrometrischen Analyse von ganzen Proteinen	92
5.1.4	Massenspektrometrische Analyse und Quantifizierung der isotopenmarkierten Peptide	96
5.1.5	Diskussion	102
<b>5.2</b>	<b>Atmungskettensuperkomplexe aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	<b>106</b>
5.2.1	Untersuchungen im blau-nativen Gel	108
5.2.2	Aktivitätstests	113
5.2.3	Zweidimensionale Gelanalyse mit 2D BN/BN Gelen	116
5.2.4	Zweidimensionale Gelanalyse mit 2D BN/SDS Gelen	118
5.2.5	Massenspektrometrische Analyse	122
5.2.6	Isolierung des Superkomplexes S1 für die Elektronenmikroskopie	125
5.2.7	Diskussion	131
<b>5.3</b>	<b>Altersabhängigkeit der Quantität von Atmungskettensuperkomplexen im <i>Rattus norvegicus</i> Gehirn</b>	<b>135</b>
5.3.1	Tiere	135
5.3.2	Auftrennung der Atmungskettensuperkomplexe durch 2D-BN/SDS-Gelelektrophorese	136
5.3.3	Altersbezogene Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe	140
5.3.4	Diskussion	146
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>150</b>



---

# 1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Anordnung mitochondrialer Atmungskettenkomplexen zu sogenannten Superkomplexen und mit der aus Chloroplasten stammenden  $F_0F_1$ -ATP-Synthase. Hierbei wird insbesondere die Veränderung in der Oligomerisierung der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase sowie in der Superkomplexbildung durch veränderten Metabolismus (*Chlamydomonas reinhardtii*) und durch den Einfluss des Alterns (*Rattus norvegicus*) untersucht.

Das Mitochondrium ist als das Kraftwerk der Zelle bekannt, denn es beherbergt neben den Enzymen des Citratzyklus und der Fettsäuresynthese auch die fünf Proteinkomplexe der Atmungskette in ihrer inneren Membran. Vier dieser Komplexe bilden die Elektronentransportkette und bewerkstelligen die Übertragung der Elektronen von den Redoxequivalenten NADH und  $FADH_2$  auf molekularen Sauerstoff, während drei von ihnen gleichzeitig einen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran aufbauen. Dieser elektrochemische Protonengradient treibt die ATP-Synthase an. Etwa 90% des ATPs, das aerobe, eukaryotische Organismen verbrauchen, wird auf diese Weise generiert; dies verdeutlicht die essentielle Wichtigkeit dieser Enzymkomplexe.

Die Atmungskettenkomplexe selbst liegen nicht, wie früher allgemein, und von vielen auch heute noch angenommen, einzeln und lateral frei beweglich in der Membran vor, sondern sie lagern sich zu verschiedenen Superkomplexen zusammen. In dieser Arbeit werden mittels blau-nativer und mehrdimensionaler Gelelektrophorese sowie durch Antikörper- und Aktivitätsuntersuchungen und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie erstmalig die Atmungskettensuperkomplexe aus Mitochondrien der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben. Anders als alle bisher untersuchten Pflanzen bildet die Alge keinen Superkomplex a aus, der aus Komplex I (NADH:Ubiquinon-Oxidoreductase) und einem Dimer von Komplex III (Ubiquinol:Cytochrom-c-Oxidoreductase) besteht. Dagegen bildet die Alge nur zwei Atmungskettensuperkomplexe S1 und S2, die zusätzlich Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) enthalten und die Stöchiometrie  $I_1III_2IV_1$  und  $I_1III_2IV_2$  besitzen; somit

---

entsprechen sie den zuerst für Rinderherz beschriebenen Superkomplexen b und c. Die entwickelte Methodik der Gewinnung des Superkomplexes S1 ( $I_1III_2IV_1$ ) ermöglichte seine erste elektronenmikroskopische Darstellung.

Neben der mitochondrialen ATP-Synthase besitzt *Chlamydomonas reinhardtii* eine weitere ATP-Synthase des  $F_0F_1$ -Typs in ihren Chloroplasten ( $CF_0F_1$ ). Dieses Enzym ist die bislang einzige nicht-mitochondriale ATP-Synthase, für die Dimere nachgewiesen wurden. In der vorliegenden Arbeit wird durch die in vivo Markierung der Algen mit dem stabilen Stickstoffisotop  $^{15}N$  und einer quantitativen massenspektrometrischen Analyse gezeigt, dass die Dimerisierung der  $CF_0F_1$  vom metabolischen Zustand der Zelle abhängig ist. Sie kann also - anders als mitochondriale ATP-Synthase-Dimere - eine regulatorische Funktion besitzen, die möglicherweise die ATP-Produktion der Chloroplasten herunterregelt, wenn die Zelle andere Nahrungsquellen nutzt. Der Anteil an Dimeren in Zellen, die photomixotroph wachsen, also ihre Energie aus Licht und organischen Molekülen gewinnen, liegt um das 2,5-fache höher als in den ebenfalls untersuchten photoautotrophen Zellen, die ihre Energie ausschließlich aus der Photosynthese beziehen.

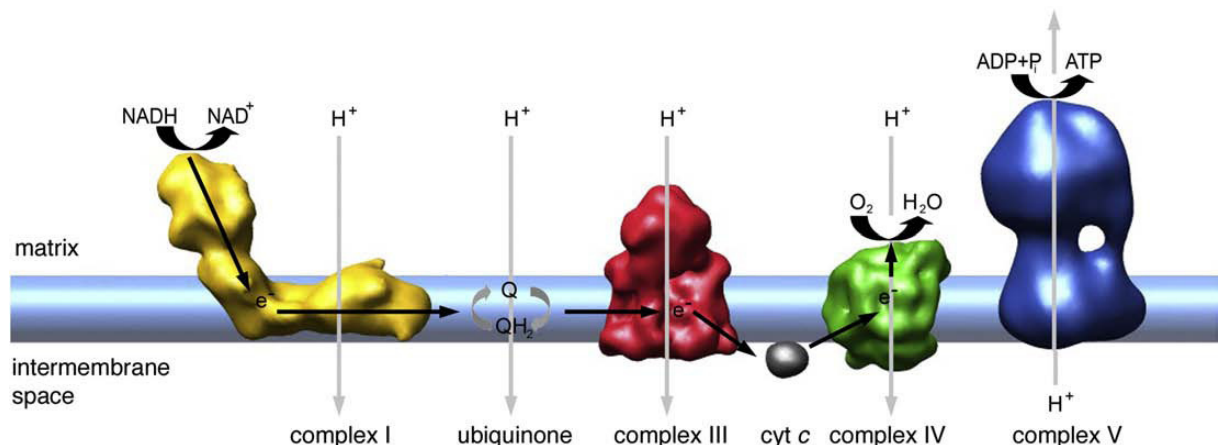
Eine weitere in dieser Arbeit beschriebene vergleichende quantitative Proteomanalyse wird an Ratten dreier verschiedener Altersgruppen durchgeführt. Die Atmungskettenkomplexe und Superkomplex-Zusammensetzungen wurden durch Antikörperanalysen und durch ein- und mehrdimensionale sowohl blau-native als auch denaturierende Gelelektrophorese quantifiziert. Die Experimente zeigen eine Abnahme des Gehalts an Komplex III und V im Bezug auf den Gesamtproteingehalt, im Fall von Komplex III als eine stufenweise Abnahme über die drei Altersgruppen hinweg.

---

## 2 Einleitung

### 2.1 Proteinkomplexe der Atmungskette

Der Transport von Elektronen aus dem Citratzyklus über NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I) und Succinat-Q-Reductase (Komplex II), Ubichinon (Q), Q-Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III), Cytochrom c und Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV) auf Sauerstoff wird, sowie auch die Gesamtheit der beteiligten Proteinkomplexe inklusive der ATP-Synthase (Komplex V), als Atmungskette bezeichnet (siehe Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1: Die Atmungskette der Mitochondrien.** Die Proteinkomplexe I bis IV (II ist hier nicht gezeigt) übertragen Elektronen von NADH (durch Komplex I) und FADH<sub>2</sub> (durch Komplex II) aus dem Citratzyklus und der Glycolyse auf Wasser. Die daraus umgewandelte Energie wird zum Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran genutzt. Angetrieben durch den elektrochemischen Protonengradienten synthetisiert Komplex V ATP aus ADP und anorganischem Phosphat. (Quelle: Vonck and Schäfer, 2009)

Ihre Funktion ist die Regenerierung von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und freiem Phosphat.

In der Atmungskette nutzen die Komplexen I, III und IV die elektronenmotorische Kraft der durch NADH und FADH<sub>2</sub> übertragenen Elektronen, um einen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran aufzubauen. Komplex II trägt zwar selbst nicht zum Aufbau des Gradienten bei, sorgt aber dafür, dass auch

---

von FADH<sub>2</sub> gebundene Elektronen auf Ubiquinon und somit auf Komplex III und IV übertragen werden. Der elektrochemische Protonengradient treibt die durch die ATP-Synthase katalysierte Phosphorylierung von ADP zu ATP an. Jedes Molekül ATP wird im menschlichen Körper bis zu 300-mal pro Tag aus ADP regeneriert. Pro Tag werden über 80 kg ATP gespalten, um Energie für endergonische Prozesse bereitzustellen (Berg et al., 2007). Die Bedeutung des Verständnisses von Aufbau, Funktionsweise und Zusammenspiel der beteiligten Proteinkomplexe wird angesichts dieser Zahlen deutlich.

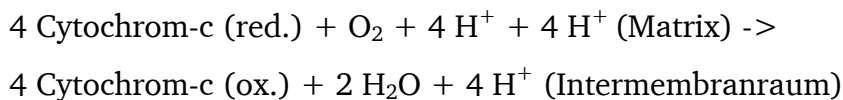
Die einzelnen Komplexe der Atmungskette sind elektrophoretisch, molekularbiologisch und elektronenmikroskopisch bereits gut untersucht und beschrieben worden. Komplex I, die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase, ist mit 1000 kDa (*Rattus norvegicus*) bzw. 800 kDa (*Chlamydomonas reinhardtii*) der schwerste. Er besteht im Fall der Ratte aus 45 Untereinheiten (Schilling et al., 2005) und besitzt generell eine L-förmige Struktur, bei der sich ein Arm in die Membranebene erstreckt und in die Matrix reicht und der andere von der Membran absteht. Hier befindet sich als prosthetische Gruppe ein Flavinmononukleotid, das zwei Elektronen von NADH aufnimmt. Das NADH wird so zu NAD<sup>+</sup> oxidiert und die Elektronen werden einzeln an mehrere in Reihe angeordnete Eisen-Schwefel-Cluster weitergeleitet, ehe sie schließlich an das im Inneren der Membran gelöste Ubiquinon abgegeben werden, das an Komplex I bindet und zu Ubiquinol reduziert wird. Die Energie, die diese Redoxreaktion bereitstellt, wird gleichzeitig genutzt, um vier Protonen von der Matrixseite in den Intermembranraum zu pumpen.

Ubiquinol transportiert die Elektronen von den Komplexen I und II (hier stammen sie aus der Oxidation von Succinat zu Fumarat) zum Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex (Komplex III), der auch nach seiner Funktion Ubiquinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase genannt wird. Der mitochondriale Komplex besteht in Ratte und in Rind aus 11 Untereinheiten (Sun et al., 2003) und liegt in katalytisch aktiver Form immer als Dimer vor (Saraste et al., 1981). In einer weiteren Redoxreaktion wird hier Ubiquinol wieder zu Ubiquinon reduziert und gleichzeitig Cytochrom-c, ein weiterer Elektronenüberträger, oxidiert. Außerdem wird Ubiquinol/Ubiquinon im sogenannten Q-Zyklus genutzt, um zwei Protonen über die Membran zu transportieren. Das katalytische Zentrum des Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplexes wird von dem „Rieske“-Eisen-

---

Schwefel-Protein und den beiden Cytochromen b und c1 gebildet, die zwei und eine Hämgruppe enthalten, welche dem Cytochrom (a. d. Griech. „Zellfarbstoff“) seinen Namen geben.

Der Elektronenüberträger Cytochrom c besitzt ebenfalls eine farb- und namensgebende Hämgruppe. Er transportiert jeweils ein Elektron durch den Intermembranraum von Komplex III zu Komplex IV, der Cytochrom-c-Oxidase. Sie besitzt in Ratte und Rind jeweils 13 Untereinheiten und katalysiert die Reaktion



Das katalytische Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase beinhaltet zwei Hämgruppen, sowie zwei Kupfer-Zentren. Insgesamt werden für einen Reaktionszyklus vier Elektronen benötigt, also vier Cytochrom-c oxidiert, um 4 Protonen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen und 4 Protonen von der Matrix in den Intermembranraum zu transportieren.

Die Atmungskettenkomplexe Komplexe I, III und IV bilden in bisher allen untersuchten Organismen verschiedene heterogene Superkomplexe (siehe auch Kapitel 5.2), es ist jedoch bisher nicht vollständig geklärt, welcher Vorteil darin liegt. Vermutet werden unter anderem die Begünstigung der Reaktionen durch Substratkanalisierung, die Stabilisierung der einzelnen Komplexe, die Verringerung der ROS-Entstehung und die Möglichkeit einer dichteren Packung der Proteine in der Membran. Superkomplexe in der Atmungskette wurden bereits in den unterschiedlichsten Organismen gefunden, in höheren Pflanzen, verschiedenen Tieren, Pilzen, eukaryotischen und prokaryotischen Einzellern (Schägger and Pfeiffer, 2000; Eubel et al., 2003; Eubel et al., 2004a; Krause et al., 2004a; Krause, 2006; Krause et al., 2006; Reifschneider et al., 2006). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Superkomplexe I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> und I<sub>1</sub>III<sub>2</sub> aus Rinderherzmitochondrien liegen vor (siehe Abbildung 5.8). Da Superkomplexe der Atmungskettenkomplexe I, III und IV bisher jedoch nicht in ihrer nativen Umgebung abgebildet wurden, sondern nur nach der Isolierung aus der Membran, ist die Theorie der Superkomplexe noch nicht allgemein anerkannt. So werden in der aktuellen Ausgabe des Lehrbuchs „Biochemistry“ von Voet und Voet (2004) Superkomplexe nicht erwähnt, bzw. es wird die gegenteilige „random collision“ Theorie unterstützt. Die neue Auflage des Biochemie-Lehrbuchs

---

von Stryer (Berg et al., 2007) dagegen führt den Begriff des Respirasoms ein, auch wenn dieses hier fälschlicherweise aus „den Komplexen I, II und II“ besteht, statt aus I, III und IV. Letzte Zweifel an der Existenz von Atmungsketten-Superkomplexen können jedoch vermutlich erst über deren Nachweis in der nativen Membran ausgeräumt werden.

Im Pflanzen scheinen einige Komplexe der Atmungskette außerdem zusätzliche Funktionen zu erfüllen, so ist zum Beispiel ein Enzym der Ascorbinsäure-Biosynthese Teil von Komplex I (Millar et al., 2003); die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) ist ein integraler Bestandteil von Komplex III.

### 2.1.1 Die $F_0F_1$ -ATP-Synthase

ATP-Synthasen des  $F_0F_1$ -Typs oder F-Typs, kommen in der inneren Membran der Mitochondrien, in der Thylakoidmembran von Chloroplasten sowie in der Plasmamembran von Bakterien vor. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich speziell mit chloroplastidischen und mitochondrialen  $F_0F_1$ -ATP-Synthasen aus *Chlamydomonas reinhardtii*, sowie mit mitochondrialen  $F_0F_1$ -ATP-Synthasen aus *Rattus norvegicus*. Gemeinsam ist allen F-Typ-ATP-Synthasen der Aufbau aus zwei großen Subkomplexen. Der membranintegrale  $F_0$ -Teil (so benannt nach seiner Oligomycin-Sensitivität) und der hydrophile  $F_1$ -Teil. Der  $F_0$ -Teil besteht unter anderem aus 10 bis 14 Exemplaren einer kleinen, die Membran durchspannenden Untereinheit, die je nach Spezies als III, c oder Su9 bezeichnet wird (Devenish et al., 2008). Sie kanalisiert Protonen entlang des elektrochemischen Gradienten von einer Seite der Membran zur anderen, bzw. in Bakterien auch unter Spaltung von ATP gegen den elektrochemischen Gradienten (ATPase-Funktion). Bei der ATP-Synthese wird durch die protonenmotorische Kraft der Ring des  $F_0$ -Subkomplexes in eine Rotationsbewegung versetzt, die über einen zentralen Stiel auf den  $F_1$ -Teil übertragen wird. Hier wird durch Drehung eine Konformationsänderung induziert, und so die Bildung von ATP aus ADP und Phosphat katalysiert. Der  $F_1$ -Subkomplex rotiert dabei selbst nicht. Die beiden Subkomplexe sind außerdem über einen peripheren, ebenfalls nicht rotierenden Stiel miteinander verbunden, der den Komplex stabilisiert, und, zumindest in einigen Organismen an der Dimerisierung der ATP-Synthase (siehe

---

Kapitel 5.1, Abbildung 5.1) beteiligt ist. In den Mitochondrien einiger Grünalgen, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carterii* und *Polytomella sp.*, wurde ein peripherer Stiel mit deutlich verändertem Aufbau gefunden. Diese Besonderheit im Aufbau wurde als möglicher Grund für die außergewöhnliche Stabilität der mitochondrialen ATP-Synthase-Dimere in *Chlamydomonas reinhardtii* genannt (Vazquez-Acevedo et al., 2006).

## 2.2 Quantitative Proteomanalyse

Die Analyse des Proteoms, also der Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, wurde in den letzten Jahrzehnten zu einem wachsenden Forschungsgebiet, das eine immense Größe besitzt. Denn nicht nur die Zahl, der Aufbau, die Funktion und verschiedenste posttranslationale Modifikationen der verschiedenen Proteine eines Organismus sind hierbei von Interesse, sondern auch die Konzentration jedes einzelnen in der Zelle. Ein Protein kann in wenigen Exemplaren pro Zelle vorliegen oder aber einen großen Teil der Zellmasse betragen. Anders als das Genom, das die DNS eines Lebewesens umfasst, ist das Proteom veränderlich, und jede einzelne Untersuchung liefert nur eine Momentaufnahme einer ständigem Wandel unterliegenden Gesamtsituation. Praktisch alle Reaktionen auf Signale von außen, derer eine Zelle fähig ist, bedeuten eine Veränderung ihrer Proteinzusammensetzung, also des Proteoms. Aus dieser Tatsache resultierend gibt es Unterschiede im Proteom jedes Organs, jeder darin enthaltenen Zellart, es ist abhängig vom Alter und dem metabolischen Zustand. Es kann sich mit der Sonneneinstrahlung, der Temperatur, mechanischer Belastung, der Zusammensetzung der Luft, Stress und vermutlich auch mit jedem anderen denkbaren Faktor, mit denen ein Lebewesen konfrontiert wird, ändern. Das gilt für ein einzelnes Individuum. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen, und sei es der gleichen Art, sind noch weit komplexer.

Für den Forscher bedeutet das unter anderem, dass die Bedingungen, unter denen das Proteom der Testobjekte untersucht werden soll, sehr genau kontrolliert werden müssen. Die Anzahl der untersuchten Organismen muss hoch genug sein. Es bedeutet

---

aber auch, dass die Beurteilung von Ursache und Wirkung sehr genau durchdacht und begründet werden muss. Und es bedeutet, dass neben dem Vorhandensein von bestimmten Proteinen immer auch ihre Menge, bzw. Konzentration in der Zelle betrachtet werden muss. Ein reines „Sammeln“ von Proteinen kann daher nur als Grundlage für die Proteomforschung angesehen werden, nicht als deren Ziel.

Die quantitative Proteomanalyse versucht beides zugleich. Proteine werden voneinander getrennt, identifiziert und quantifiziert; das alles bei mindestens zwei unterschiedlichen Zuständen, so dass Veränderungen beobachtet und interpretiert werden können. Um signifikante Unterschiede feststellen zu können ist es wichtig, die Unterschiede in den Proben möglichst gering zu halten. Je mehr sich die in einem Experiment untersuchten Proben unterscheiden, desto schwieriger ist es, die resultierenden Unterschiede im Proteom ihren Ursachen zuzuordnen.

Eine quantitative Proteomanalyse beinhaltet fast immer zwei essentielle methodische Komponenten. Die erste ist die Markierung der Proben. Sollen die Proben vermischt bearbeitet werden, ist eine Markierung zwingend erforderlich und es müssen zwei unterschiedliche Markierungen benutzt werden. Die Markierung kann unterschiedliche Aspekte der Proteine betreffen, wie etwa die Masse, optische Eigenschaften oder das Vorhandensein bestimmter kennzeichnender Moleküle (engl. „tags“). Die zweite Komponente der quantitativen Proteomanalyse ist die Trennung der unterschiedlichen Proteine, bzw. der unterschiedlichen Proteinkomplexe. Hier kommen verschiedene Methoden, wie Polyacrylamid-Gelelektrophoresen, Dichtegradientenzentrifugationen, Westernblots oder Massenspektrometrie zum Einsatz, je nach Art der Fragestellung.

Am Ende bleibt die Bewertung der Daten, die nicht weniger hohe Ansprüche stellt als deren Gewinnung. Oft wird die Frage nach der Änderung einer bestimmten Proteinkonzentration gestellt, also nach einer relativen Proteinmenge, die im Verhältnis zu einer anderen steht. Die Berechnung dieser Verhältnisse kann ohne externen Maßstab vorgenommen werden, muss aber vorsichtig interpretiert werden, da ein Verhältnis ohne Maßstab nicht in eine Menge oder Konzentration umgerechnet werden kann. Die Messung absoluter Mengen wiederum erlaubt eine direkte Aussage, sie kann aber leicht durch Messfehler verfälscht werden und ist auch nicht für jede Art der Untersuchung sinnvoll, bzw. notwendig.



---

### 2.2.1 Densitometrische Methoden

Am bekanntesten und auch am häufigsten eingesetzt werden optische Methoden zur Quantifizierung von Proteinen. Dazu zählen die „klassischen“ Proteinbestimmungen wie Biuret, der Lowry-Test (Lowry et al., 1951) und dessen Weiterentwicklung nach Hartree, der Bradford-Test und die Messung der Absorption oder Fluoreszenz von farbigen Cofaktoren oder von aromatischen Aminosäuren, insbesondere Tryptophan. Alle diese Methoden werden auf Proteine in wässriger Lösung angewandt. In der Proteomforschung kommen zur Quantifizierung aufgetrennter Proteine im Polyacrylamidgel oder auf einer Blotmembran dagegen quantitative Färbungen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Färbereagenzien zum Einsatz.

Eine quantitative Färbung bedeutet, dass ein Farbstoff in einem bestimmten Verhältnis an ein Protein bindet. Auf diese Art wird es möglich, die Menge des Proteins mit der Menge des gebundenen Farbstoffes zu korrelieren. Dabei sind zwei Eigenschaften des Farbstoffes von entscheidender Bedeutung. Die erste ist die Sensitivität, die die kleinste Menge an Protein bezeichnet, die mittels des Farbstoffes sichtbar gemacht werden kann. Die zweite ist der dynamische Bereich, also der Bereich zwischen geringster und höchster Proteinmenge, die quantitativ angefärbt werden kann. Er wird auch als „Bereich der linearen Färbung“ oder „linearer Bereich“ bezeichnet. Der dynamische Bereich ist beispielsweise bei der in Kapitel 4.10.3 beschriebenen Silberfärbung nach Blum sehr gering und beträgt nur eine dezimale Größenordnung (Gromova and Celis, 2006). Aus diesem Grund ist diese Färbung nicht für die quantitative Proteomanalyse geeignet, obwohl sie mit 1-5 ng Protein pro Bande eine hohe Sensitivität besitzt (Blum et al., 1987).

Besser geeignet ist die Färbung mit Coomassie R-250 nach Görg und Rexroth (siehe Kapitel 4.8.1 und 4.10.1), die zwar einen annehmbaren dynamischen Bereich von zwei dezimalen Größenordnungen, aber eine geringe Sensitivität von 0,1 bis 1 µg besitzt. Die kolloidale Coomassiefärbung verbessert die Sensitivität auf etwa 30 ng (Herstellerangabe Roti<sup>®</sup>Blue), indem die Hintergrundfärbung stark reduziert wird. Coomassie ist ein Triarylmethan-Farbstoff, der an positiv geladene Aminosäuren sowie an die hydrophoben Bereiche eines Proteins oder Proteinkomplexes bindet. Aus

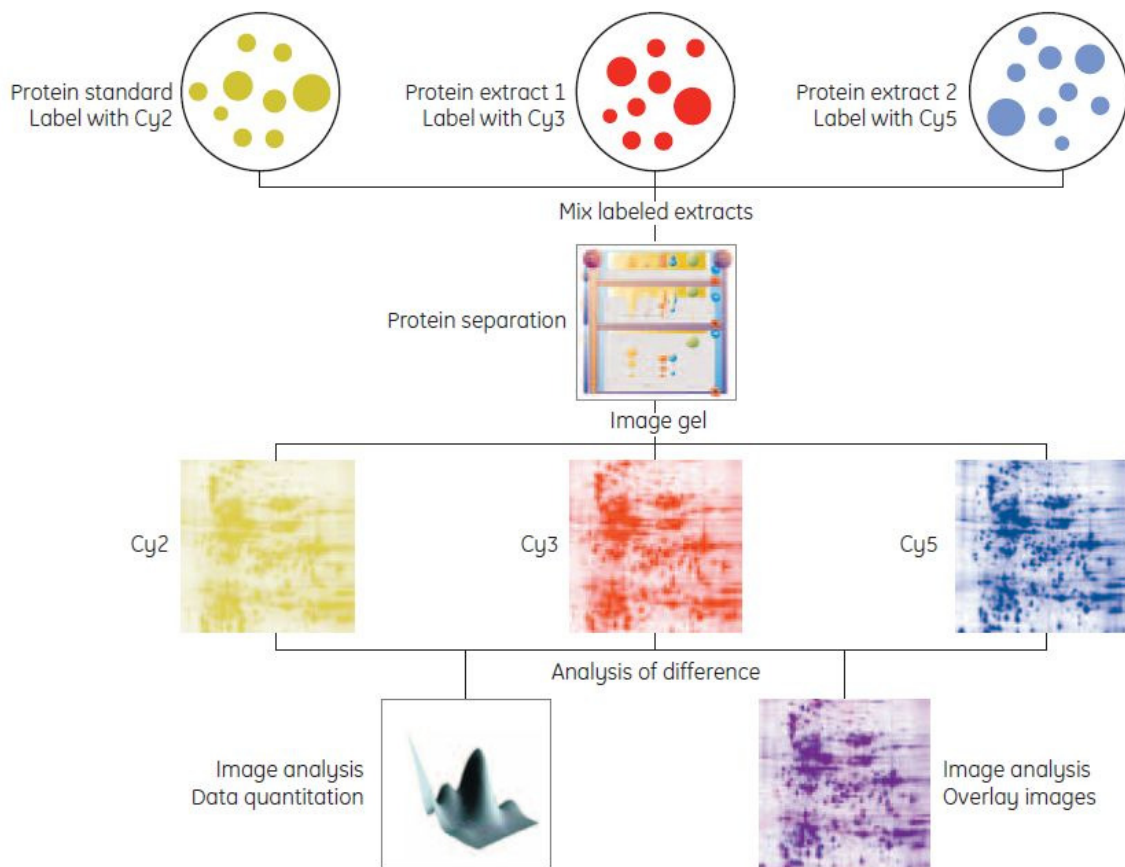
---

diesem Grund kann die Farbintensität bei unterschiedlichen Proteinen variieren, und bei Verwendung dieses Farbstoffes sollten deshalb quantitative Vergleiche nur zwischen gleichen oder ähnlichen Proteinen angestellt werden.

Die Zink-Imidazol-negativ-Färbung (Fernandez-Patron et al., 1992) färbt die Gelmatrix weiß an, während Stellen im Gel, an denen sich Protein befindet nicht gefärbt werden. Dass die Proteine bei dieser Methode nicht gefärbt werden, kann ein Vorteil sein, wenn sie aus dem Gel gewonnen und weiter untersucht werden sollen. Die Sichtbarkeit der durchsichtigen Spots in einem weißen Gel ist allerdings schlechter als bei den anderen (positiv-)Färbungen. Die Methode hat eine hohe Sensitivität von 5 ng, jedoch keinen linearen Bereich, da alle Protein-Spots durchsichtig bleiben und somit die gleiche, nämlich keine Färbung besitzen.

Um den in den letzten Jahren wachsenden Bedarf an Farbstoffen zur (differentiellen) Proteomanalyse zu decken, wobei ein großer dynamischer Bereich sowie eine hohe Sensitivität notwendig sind, wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt. Einige, wie die an die Aminosäure Lysin kovalent bindenden CyDyes, werden zur Markierung der Proteine vor der Gelelektrophorese eingesetzt, um hinterher auf dem gleichen Gel Unterschiede in den gemeinsam aufgetragenen und mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Proben festzustellen (DIGE System- Differential In Gel Electrophoresis, siehe Abbildung 2.2).

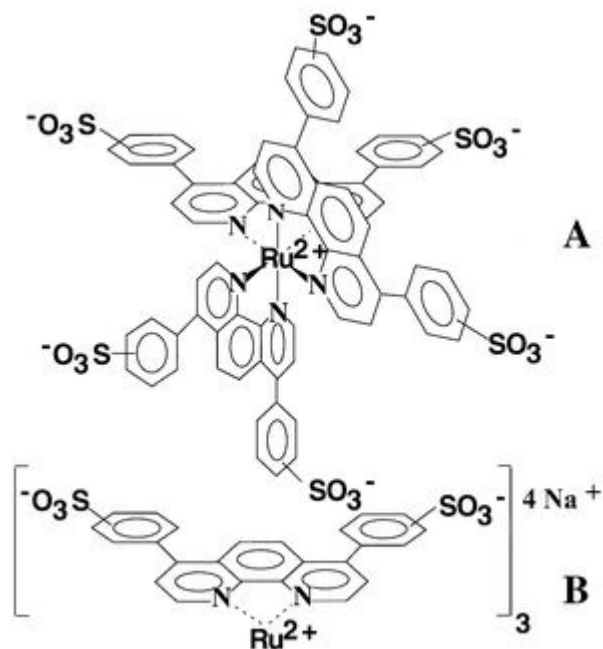
Die vor der Elektrophorese an die Proteine zu koppelnden Fluoreszenzfarbstoffe wurden zwar früh entwickelt (Duffy et al., 1989; Kirley, 1989), haben sich jedoch außerhalb ihrer Anwendung für DIGE nicht durchgesetzt, da sie, gerade für die Methode der isoelektrischen Fokussierung, sowie für die Sequenzierung durch MS-Analyse oder Edman-Abbau entscheidende Nachteile mit sich bringen. Die Farbstoffe binden an basische Aminosäuren, entweder an Aminogruppen, oder an Cystein. Sie können so die Ladung des Proteins, seinen pI und somit sein Laufverhalten in der isoelektrischen Fokussierung verändern. Im blau-nativen Gelsystem dagegen ist eine Beeinflussung des Laufverhaltens der Proteinkomplexe durch die Koppelung der Farbstoffe nicht zu erwarten, und die Markierung kann hier erfolgreich durchgeführt werden (Dani and Dencher, 2008).



**Abbildung 2.2: DIGE-System zur Untersuchung zweier unterschiedlicher Proteinproben** auf dem gleichen Gel. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt und detektiert, auf diese Weise werden verschiedene Proben sowie ein Standard (üblicherweise eine Mischung aus allen untersuchten Proben) auf einem Gel quantifiziert. Quelle: GE-Healthcare, 2-D Electrophoresis: Principles and Methods

Die Mehrzahl der verwendeten Farbstoffe wird nach der Elektrophorese verwendet, wie die Sypro<sup>®</sup> Farbstoffe (Molecular Probes), Flamingo (Bio-Rad), Deep Purple<sup>™</sup> (GE Healthcare), IRDye<sup>®</sup> (LI-COR), FlaSH<sup>Pro</sup> Dyes (Raytest) oder die LUCY Farbstoffe (Sigma). Sie färben schon ein bis wenige ng Protein an, und ihr dynamischer Bereich umfasst, im Fall von Sypro Ruby, mehr als vier dezimale Größenordnungen (Berggren et al., 2000). Fluoreszenzfarbstoffe sind generell in unterschiedlicher Ausprägung lichtempfindlich, weshalb die Färbeprozedur im Dunkeln stattfinden soll, und bei der Weiterbehandlung der Proteinspots muss entweder ein spezieller Lichttisch verwendet werden, oder das Gel muss mit einem für das menschliche Auge sichtbaren Farbstoff ein weiteres Mal gefärbt werden. Die Farbstoffe selbst besitzen unterschiedliche Strukturen und binden durchweg nicht-kovalent durch hydrophobe

Wechselwirkungen an SDS und an entsprechende Proteindomänen (Schrattenholz, 2001). Sypro<sup>®</sup>Ruby oder das ähnliche Ruthenium-II-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat) (Rabilloud et al., 2001) sind Ruthenium-Chelat-Komplexe (siehe Abbildung 2.3), die Strukturen anderer Farbstoffe wurden bisher nicht veröffentlicht.



**Abbildung: 2.3: Struktur von Ruthenium-II-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat).**

Dieser Chelat-Komplex bindet durch hydrophobe Wechselwirkungen an Protein und ermöglicht so deren Sichtbarmachung durch eine Fluoreszenzuntersuchung. Abbildungsteil A zeigt die dreidimensionale Struktur des Komplexes, Teil B die gleiche Struktur in planarer Darstellung (Rabilloud et al., 2000).

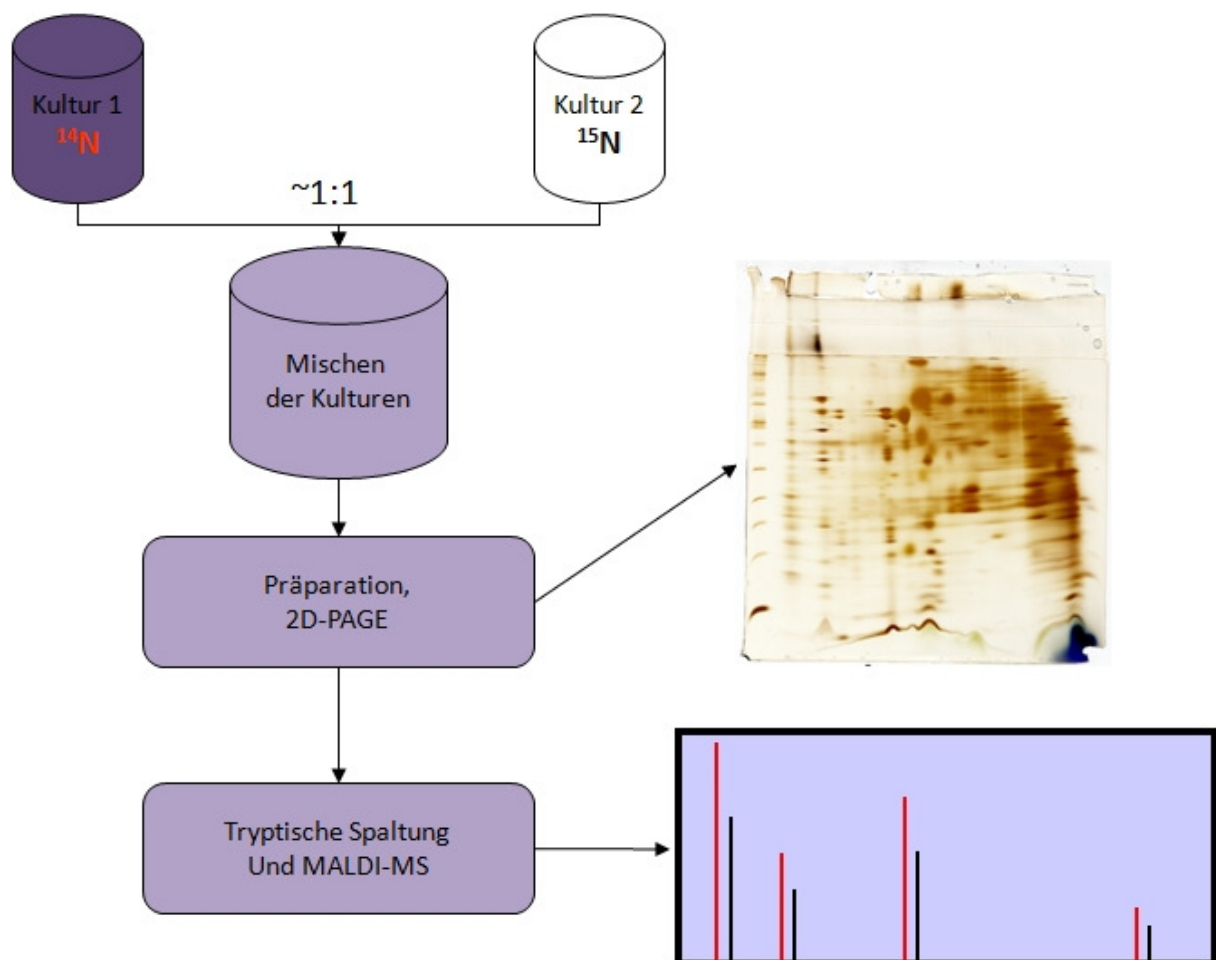
Allen Farbstoffen gemeinsam ist, dass sie nur im Bezug auf gleiche Proteine wirklich quantitativ anfärben. Die Färbung von Proteinen, die sich im Bezug auf die Anzahl ihrer Aminosäuren und ihre Hydrophobizität unterscheiden, ist bei keiner Färbemethode für Proteingele quantitativ, da sie in unterschiedlicher Zahl an diese Proteine binden.

### 2.2.2 Massenspektrometrische Methoden

Die Massenspektrometrie bietet eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden der quantitativen Proteomanalyse. Mit Hilfe neuer Geräte und Techniken ist dabei die Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in einem Arbeitsgang möglich. Je nach Fragestellung ist jedoch die Quantifizierung auch mit Hilfe eines einfachen MALDI-TOF-Massenspektrometers möglich.

Die Art der Markierung der Proteine hängt wiederum von der Fragestellung ab und von der Art des verfügbaren Massenspektrometers. Die frühestmögliche Markierung

findet mit stabilen Isotopen während des Wachstums des Labortieres/der Pflanze oder der Zellkultur statt. Hier werden den Organismen ausschließlich Nährstoffe angeboten, die nur oder zumindest zu einem überwiegenden Anteil bestimmte schwere Isotope von Stickstoff ( $^{15}\text{N}$ ) oder Kohlenstoff ( $^{13}\text{C}$ ) enthalten. Als Resultat erhält man einen Organismus oder Zellen, die nicht die natürliche Isotopenverteilung von Stickstoff oder Kohlenstoff besitzen, sondern die schwereren Isotope. Diese Vorgehensweise führt nicht nur zu isotopenmarkierten Proteinen, sondern auch zur Markierung aller anderen Strukturen des Versuchsobjektes, wie z.B. der DNS, der Lipide und Kohlenhydrate.



**Abbildung 2.4: Ablauf einer Quantifizierung über stabile Isotopen-Markierung.** Zwei Kulturen werden mit unterschiedlichen, stabilen Isotopen von in diesem Fall Stickstoff angezüchtet und anschließend, schon vor der Präparation, gemischt. Nach einer 2D-PAGE und tryptischer Spaltung der Proteine werden die einzelnen Peptide durch die Massenspektrometrie quantifiziert. Das Verhältnis von  $^{14}\text{N}$  zu  $^{15}\text{N}$  Peptid entspricht der Menge des zugehörigen Proteins in Kultur 1 im Vergleich zu Kultur 2.

---

Der größte Vorteil dieser Methode liegt darin, dass, angefangen bei der Präparation der Organellen, die unterschiedlichen Proben vermischt und gemeinsam bearbeitet werden können. Alle präparationsbedingten Artefakte können somit ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 2.4).

Die ICAT-Technologie (Isotope Coded Affinity Tags) kombiniert die Quantifizierung mit der Selektion bestimmter Proteine. Es kommen zwei verschiedene Antikörper zur Markierung des gesuchten Proteins zum Einsatz, wovon einer mehrfach deuteriert ist. Zunächst wird das Protein damit markiert und enzymatisch gespalten, anschließend in einer Affinitätschromatographie das gesuchte Peptid anhand des gebundenen Antikörpers gewonnen, im Massenspektrometer untersucht und anhand der unterschiedlichen Massen des anhängenden Antikörpers quantifiziert.

Eine weitere Möglichkeit zur Markierung besteht beim enzymatischen Verdau der Proteine durch den Einsatz von  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , das jeweils ein Peptid durch einen Massenshift von 2 kennzeichnet.

Die iTRAQ<sup>TM</sup> (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) Reagenzien wurden speziell zur Markierung von Proteinproben vor der LC-MS/MS Analyse entwickelt. Sie binden kovalent an bestimmte Aminosäuren des Proteins oder Peptids, und zerfallen während einer mehrdimensionalen Massenspektrometrie, wobei sie Reportermoleküle unterschiedlicher Masse abspalten (siehe Abbildung 2.5).

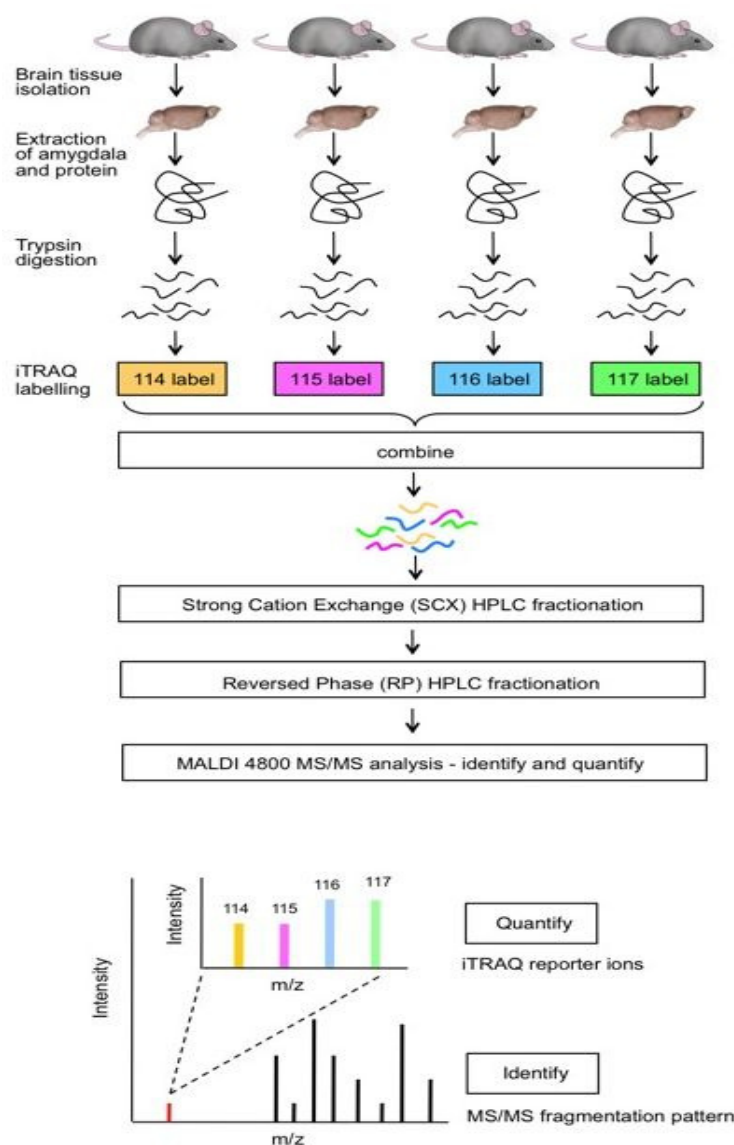


Abbildung 2.5: Die iTRAQ<sup>TM</sup>-Methode (Applied Biosystems) ermöglicht die Quantifizierung von bis zu vier unterschiedlichen Proteinproben durch LC-MS/MS. Im Beispiel werden Proteine aus vier verschiedenen Mauspopulationen tryptisch verdaut, mit den unterschiedlichen iTRAQ<sup>TM</sup>-Reagenzien markiert und gemischt. Die anschließende LC-MS/MS Analyse erlaubt die Identifikation und die Quantifizierung der Proteine in einem Schritt, da die Reagenzien nach der ersten MS-Auftrennung unterschiedlich schwere Reportermoleküle abspalten. Die Intensität der Signale dieser Reportermoleküle ist ein direktes Maß für die Menge des markierten Proteins in der jeweiligen Mauspopulation. Quelle: Nature Protocols (Tweedie-Cullen and Livingstone-Zatchej, 2009)

### 2.2.3 Immunologische Methoden

Zur Quantifizierung eines bestimmten Proteins aus einem komplexen Gemisch, beispielsweise eines SDS-Solubilisats einer Proteinprobe, besteht neben oben genannten Methoden auch die Möglichkeit, das zu quantifizierende Protein über eine Affinitätschromatographie aufzureinigen und in Lösung zu quantifizieren, oder nach PAGE auf eine Membran zu blotten, mit Antikörpern zu markieren und danach die Signalstärken der Chemolumineszenz oder der entsprechenden anderen Nachweisreaktion oder Färbung zu messen. Die Chemolumineszenz ist für diese

---

Methode gut geeignet, da sie über eine lange Zeit anhält und so extrem lange Belichtungszeiten erlaubt. Dies gewährleistet einen großen dynamischen Bereich sowie eine hohe Sensitivität, die durch die Antikörpermarkierung unter idealen Bedingungen 2 bis 10 fmol des Antigens erreicht (Harlow and Lane, 1988). Diese Methode findet unter anderem dann Anwendung, wenn das gesuchte Protein bei einer Gesamtproteinfärbung überdeckt wird, weil z.B. ein komplexes Proteingemisch betrachtet wird oder wenn nur kleine Mengen einer Probe zur Verfügung stehen. Der hohen Sensitivität und dem guten dynamischen Bereich der immunologischen Quantifizierung steht der Nachteil gegenüber, dass ein geeigneter Antikörper verfügbar sein muss.

#### 2.2.4 Normierung

Eine Normierung, also eine Methode, Daten vergleichbar zu machen, kann für eine relative Quantifizierung (Angabe der Änderung einer Menge relativ zu einer anderen Menge) ohne einen Standard erfolgen. Für eine absolute Quantifizierung (Angabe einer absoluten Menge unabhängig von anderen Messwerten) ist dieser Standard jedoch zwingend notwendig. Als internen Standard bezeichnet man einen durch die im Experiment veränderten Bedingungen unberührten Faktor, wie ein in den Proben selbst vorhandenes Protein, das in konstanter Menge vorkommt („housekeeping protein“). Ein externer Standard ist die definierte Menge eines Markers, der den Proben zugesetzt wird. Die Verwendung eines externen Standards ist immer auch eine mögliche Fehlerquelle, da er eventuell in seiner Zusammensetzung variiert oder aber auch die Genauigkeit nicht hoch genug ist, mit der er für die einzelnen Experimenten abgemessen wird. Die Verwendung eines internen Standards wäre demnach dem des externen vorzuziehen. Es ist jedoch zweifelhaft, ob bisher zu diesem Zweck genutzte Proteine, wie Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH),  $\beta$ -Actin oder  $\beta$ -Tubulin, wirklich von allen denkbaren Faktoren unbeeinflusst exprimiert werden (Ferguson et al., 2005). Um sicher zu gehen, müssten für jedes spezielle Experiment die als Standard vorgesehenen Proteine in einem Vorexperiment, hier wiederum mit einem externen Standard, daraufhin geprüft werden, ob ihre Menge konstant bleibt.



---

Die relative Normierung ohne Standard ist für viele Fragestellungen ausreichend, jedoch muss bei der Interpretation der Daten immer auf die Relativität der Vergleiche hingewiesen werden. Ein Beispiel für diese Normierung ist, alle Signale eines Experiments zu addieren, zum Beispiel alle Banden auf einem Antikörper-Blot oder alle Proteinspots auf einem 2D-Gel und dann die Einzelsignale im Bezug zum Durchschnittssignal oder zu ihrer Summe anzugeben. Unterschiede (oder deren Fehlen) zwischen den Proben können so ermittelt werden. Es ist aber nicht möglich, sie in absoluten Mengen zu beziffern.

Ergebnisse, die das Verhältnis von zwei Proteinen/Messwerten darstellen, müssen, wenn sie mit anderen Ergebnissen zusammengefasst werden, geometrisch gemittelt werden, da sich sonst ein rechnerisch falscher Wert ergibt.

Beispiel: Die Quantifizierung von zwei Proteinen A und B hat in der ersten Messung die Werte  $A_1=1$  und  $B_1=4$  ergeben, in der zweiten Messung dagegen  $A_2=4$  und  $B_2=1$ . Berechnet werden soll das durchschnittliche Verhältnis von Protein A zu B.

Arithmetisches Mittel:  $(\frac{A_1}{B_1} + \frac{A_2}{B_2}) : 2 = (1:4 + 4:1) : 2 = 2,125$

-> Falsch, das Durchschnittsverhältnis von Protein A zu B wäre nach dieser Rechnung etwa 2 zu 1.

Geometrisches Mittel:  $\sqrt{\frac{A_1}{B_1} \cdot \frac{A_2}{B_2}} = \sqrt{(1:4 \cdot 4:1)} = 1$

-> Richtig, im Durchschnitt sind die Mengen der zwei Proteine identisch.

Die Anwendung des arithmetischen Mittels darf nur vor der Ermittlung des Verhältnisses erfolgen, also ehe der Quotient gebildet wird:

$\frac{(A_1+A_2):2}{(B_1+B_2):2} = \frac{(4+1):2}{(1+4):2} = 1$  -> richtig

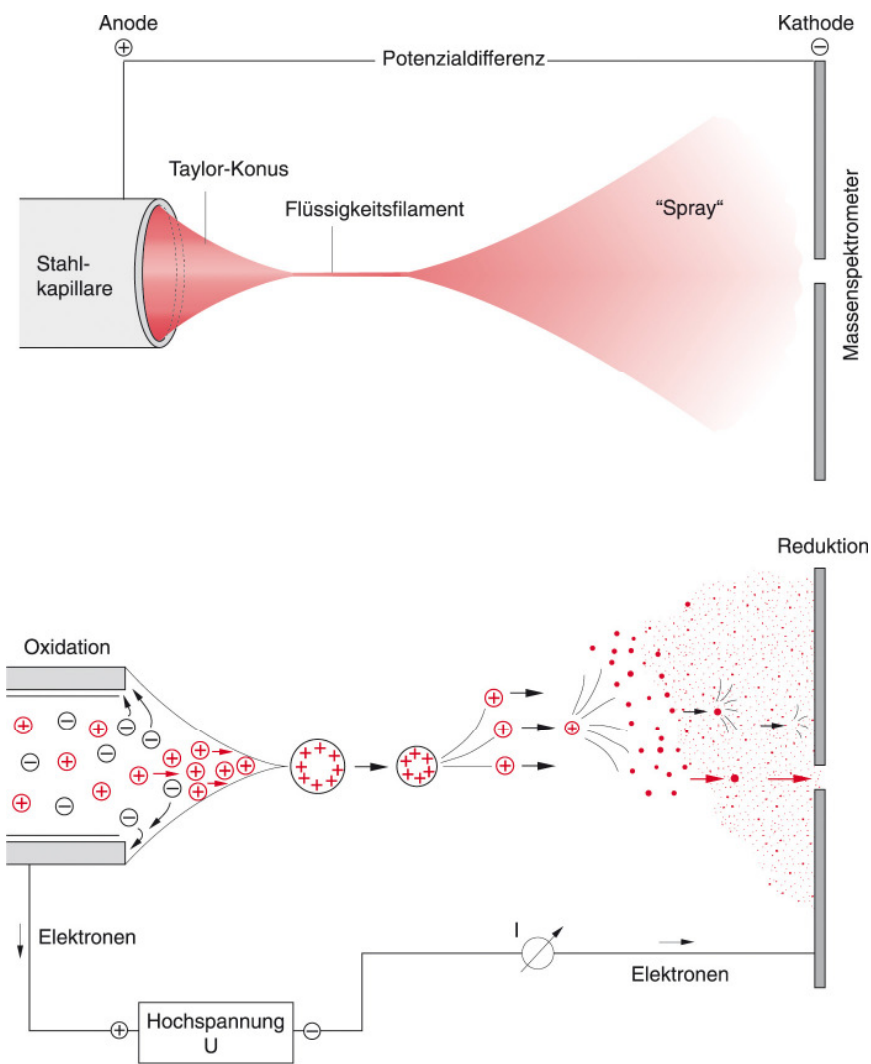
Da bei Experimenten mit relativer Quantifizierung häufig die Änderung von Verhältnissen betrachtet wird (Beispiel: Kapitel 5.1), gilt es, diese Regeln zur Mittelung der Ergebnisse zu beachten.

---

## 2.3 Massenspektrometrie in der Proteomanalytik

Die Massenspektrometrie hat in der Proteomanalytik von Anfang an eine entscheidende Rolle gespielt, ohne sie waren und sind groß angelegte Proteomprojekte nicht denkbar (Rabilloud et al., 2009). Heute werden für die meisten Proteomstudien nur zwei der bekannten Ionisierungstechniken verwendet, nämlich die Elektrosprayionisierung (ESI) und die Matrix-assistierte-Laser-Desorptions-Ionisierung (MALDI).

Die ESI wurde bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts als eine geeignete Ionisierungstechnik erkannt (Dole et al., 1968), allerdings damals noch nicht im Zusammenhang mit der Analyse von Proteinen. Das Prinzip der ESI beruht auf der Einspritzung geringer Mengen von in säurehaltigem Medium gelösten Probenmolekülen, die sich, während das Lösungsmittel verdampft, auf immer kleinere Tropfen verteilen. Die Tropfen zerplatzen schließlich durch die auf immer kleinerem Raum konzentrierteren Ladungen (Coulomb-Explosion, siehe Abbildung 2.6). Proteine oder Proteinkomplexe ionisieren in der ESI-MS höchstwahrscheinlich nach dem „Charged Residue Model“ (CRM; Winger et al., 1993). Nach diesem Modell enthalten die sich spaltenden Tröpfchen irgendwann nur noch je ein von Lösungsmittel umschlossenes Probenmolekül, auf welches dann die Ladungen komplett übertragen werden, wenn das Lösungsmittel vollständig verdampft. Ein Teil der Ionen gelangt dann über eine kleine Öffnung oder eine beheizte Kapillare in den Massenanalysator. Die anzulegende Spannung hängt hierbei von dem Durchmesser der Einspritzöffnung und von der Oberflächenspannung des Lösungsmittels ab (Smith, 1986). Als Lösungsmittel werden häufig Methanol und Acetonitril, teilweise auch gemischt mit Wasser, verwendet. Für eine Analyse reichen bereits Konzentrationen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  mol/L aus (Kearle and Verkerk, 2009). Die Nanospray-Ionisierung, eine Modifikation der ESI (Wilm and Mann, 1994; Wilm and Mann, 1996), verbessert die Sensitivität der Methode durch die Verwendung kleinerer Kapillardurchmesser, die einen besser fokussierten Ionenstrahl produzieren.



Aus Lottspeich/Engels, Bioanalytik, 2. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

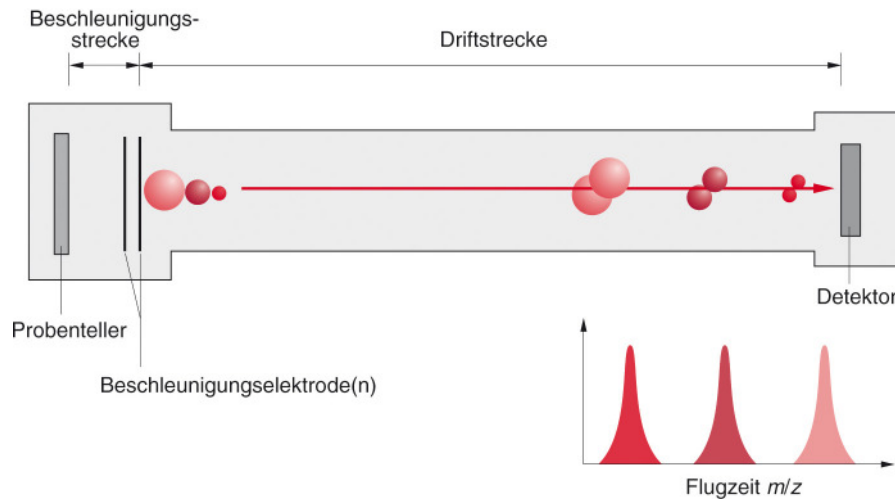
**Abbildung 2.6: Prinzip der Elektrosprayionisierung.** Die Proben werden, beispielsweise aus einer RP-HPLC, durch eine Kapillare in eine Kammer geleitet, an der eine Hochspannung anliegt. Auf diese Weise werden die Tröpfchen, die sich vom Taylor-Konus lösen durch Verdampfung des Lösungsmittels kleiner, bis sie schließlich durch die Abstoßung der auf immer kleinerem Raum konzentrierten positiven Ladungen zerplatzen (Coulomb-Explosion). Der Strahl an positiv geladenen Ionen wird weiter durch eine kleine Öffnung oder eine beheizte Kapillare in den Masseanalysator geleitet. (Quelle: Lottspeich & Engels, 2006)

Die durch ESI erzeugten Ionen eines Proteins oder Peptids sind in der Regel mehrfach geladen und ergeben so im Spektrum ein Muster entsprechend ihren unterschiedlichen Masse-Ladungsverhältnissen ( $m/z$ ). ESI-Massenspektrometer werden häufig zusammen mit Quadrupol-Analysatoren eingesetzt.

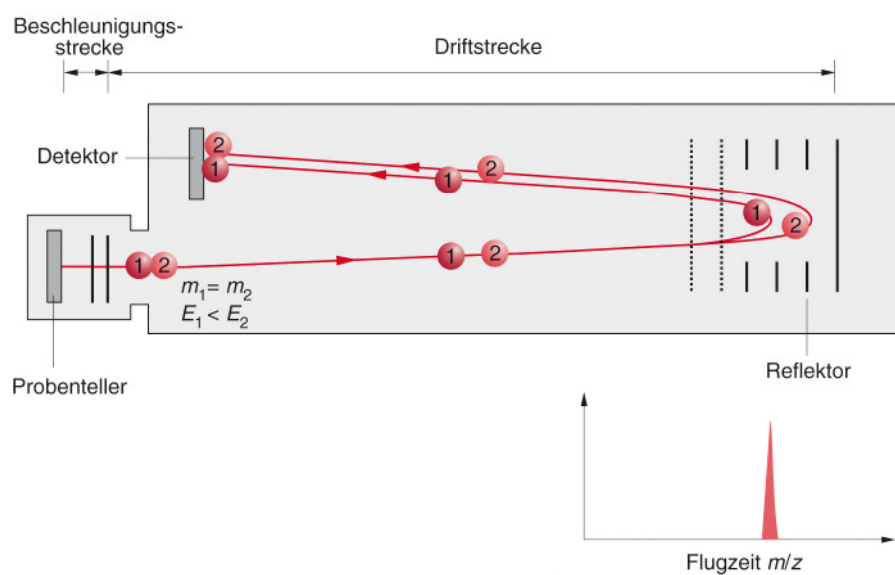
Die zweite gebräuchliche Ionisierungsmethode bei der Untersuchung von Protein- oder Peptidproben ist die MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation; Karas

and Hillenkamp, 1988). Hierbei werden die Analytmoleküle mit einem Überschuss an Matrixmolekülen zusammen kristallisiert.

### Lineares Flugrohr



### Reflektor-Flugrohr



Aus Lottspeich/Engels, Bioanalytik, 2. Aufl., © 2006 Elsevier GmbH

**Abbildung 2.7: MALDI in Kombination mit einem time-of-flight Analysator.** Die in Matrix eingebetteten Proteine werden mit der Matrix zusammen durch einen kurzen Laserpuls verdampft und ionisiert. Dann findet ihre Beschleunigung durch das angelegte elektrische Feld statt. Die feldfreie Driftstrecke wird von den Ionen in Abhängigkeit von ihrem Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) in unterschiedlicher Zeit passiert. Linear- und Reflektor-Modus ermöglichen die Detektion nach unterschiedlich langen Flugstrecken, wobei im Reflektor-Modus eine zusätzliche Fokussierung von Ionen mit gleichem  $m/z$  Verhältnis erreicht wird, die zu Beginn der Flugphase unterschiedliche Beschleunigungen erfahren hatten. (Quelle: Lottspeich & Engels, 2006)

---

Die Matrix wird so gewählt, dass sie die Wellenlänge des eingesetzten Lasers absorbiert; außerdem ist sie abhängig von der Art der zu untersuchenden Moleküle (siehe auch Kapitel 4.15). Wird die Probe unter Vakuum mit einem Laser beschossen, verdampft die Matrix, und sowohl Matrix wie auch Analytmoleküle werden aus der Oberfläche herausgeschleudert. Die Ionisierung der Analytmoleküle findet über den Transfer von Elektronen oder Protonen durch die photoionisierten Matrixmoleküle statt, der genaue Mechanismus ist hierbei jedoch noch nicht geklärt. Es entstehen, anders als bei der ESI, bevorzugt einfach geladene Ionen. Von den zur Verfügung stehenden Analysatoren werden am häufigsten die TOF (time-of-flight) und die Fourier-Transformations-Analysatoren in Kombination mit der MALDI verwendet. Diese Analysatoren ermöglichen die Aufnahme eines kompletten Spektrums pro Laserpuls. Im time-of-flight Analysator wird die Driftstrecke von den beschleunigten Ionen in unterschiedlichen Zeiten zurückgelegt: je kleiner das  $m/z$  Verhältnis, desto schneller treffen die Ionen am Ende der Flugstrecke auf den Detektor. Häufig wird ein TOF-Analysator im Reflektor-Modus betrieben. Hier werden die Ionen am Ende des Flugrohres reflektiert, wobei Ionen mit einer stärkeren Initialbeschleunigung tiefer in das Reflektorfeld eindringen und so wieder mit den weniger stark beschleunigten Ionen des gleichen  $m/z$  Verhältnisses zusammengeführt werden (siehe Abbildung 2.7 unten).

In der Proteomforschung wird die Massenspektrometrie meist in Kombination mit vorgeschalteten Trennmethode, wie der Gelelektrophorese eingesetzt. Rein auf Massenspektrometrie basierende Methoden existieren (z.B. MudPIT, Multidimensional Protein Identification Technology, LC-MS), erreichen jedoch bisher nicht die gleichen guten Ergebnisse bei komplexen Proben (Rabilloud et al., 2009).

---

## 3 Ziele der Arbeit

Es ist bekannt, dass ATP-Synthasen des  $F_0F_1$  Typs Homodimere bilden können (Allen et al., 1989; Arnold et al., 1998b; Eubel et al., 2003; van Lis et al., 2003; Krause et al., 2004a; Krause et al., 2005; Reifschneider et al., 2006). Diese Dimere wurden bisher mit einer einzigen Ausnahme in der Membran von Mitochondrien verschiedener Organismen gefunden, und es wird ihnen eine strukturgebende Rolle in der Krümmung der inneren Membran zugeschrieben (Giraud et al., 2002; Paumard et al., 2002; Gilkerson et al., 2003; Gavin et al., 2004; Minauro-Sanmiguel et al., 2005). Die angesprochene Ausnahme bildet das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Es weist eine relativ geringe Stabilität auf und zerfällt bei erhöhter Phosphatkonzentration (Rexroth et al., 2004). Es soll mittels quantitativer Proteinanalysen festgestellt werden, ob dieses Dimer eventuell Teil eines Regulationsmechanismus der Grünalge ist, mit dem auf veränderte Umweltbedingungen oder unterschiedliche metabolische Situationen reagiert wird, oder ob auch hier, wie bei den mitochondrialen ATP-Synthasen, eher eine strukturelle Funktion des Dimers anzunehmen ist.

Schonende Aufschlussmethoden für *Chlamydomonas*-Zellen haben ermöglicht, das Vorhandensein von Superkomplexen, wie den ATP-Synthase Dimeren, zu beweisen. Sie sollen nun angewandt werden, um mögliche Atmungskettensuperkomplexe der Alge zu finden und zu charakterisieren. So würde ein Vergleich zwischen dieser einzelligen Alge und höheren Pflanzen sowie Tieren und Pilzen ermöglicht, für die entsprechende Daten, anders als für Algen, bereits vorliegen (Arnold et al., 1998b; Eubel et al., 2004b; Krause et al., 2004a; Krause et al., 2004b; Reifschneider et al., 2006; Schäfer et al., 2006).

Eine weitere Aufgabe im Rahmen meiner Arbeit war die Anwendung verschiedener Techniken zur Proteinquantifizierung auf Rattenhirne von Tieren verschiedener Altersgruppen. In einer Zelle entstehen durch den Atmungsprozess in den Mitochondrien reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die für oxidative Schäden an verschiedenen Zellstrukturen, wie der mtDNA verantwortlich gemacht werden und als

---

eine Ursache von Alterungsprozessen betrachtet werden (Ames et al., 1995). Besonderes Augenmerk soll daher auf Veränderungen in der Quantität und in den Interaktionen der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe gelegt werden, die zwischen jungen und alten Tieren bestehen könnten.

---

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte und Computersoftware

Delta 2D 3.4	Decodon
Densitometer GS-800	Biorad
Dual Gel Caster	Hoefer
Flow LaminAir HLB 2448	Heraeus
Gel Schüttler 3016	GFL
Gel Schüttler HS 260	IKA
Gelelektrophorese Apparatur 2050 Midget	LKB
Gelelektrophorese Apparatur SE 400	Amersham Pharmacia
Gelelektrophorese Apparatur SE 600 Ruby	Amersham Pharmacia
Gel-Gießapparatur SE 245	Amersham Pharmacia
Gradientenmischer 38 mL	Werkstatt des FB Chemie
Gradientenmischer 68 mL	Werkstatt des FB Chemie
Haematocytometer Neubauer improved	Marienfeld
Image Reader Software	Fuji
Inkubator IS 2-K	Incubec
LAS 300 Epi-B Set E	Fuji
LAS 3000 Epi Tray	Fuji
LAS 3000 Epi-B Set E	Fuji
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fuji
Lichtmikroskop M35	Zeiss
Lichtplatte	Hama
Lichttisch	Heraeus
Magnetrührer Combimag Reo	IKA Labortechnik
Magnetrührer Mini MR	IKA Labortechnik
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
MALDI-Probenplatte V700666	Applied Biosystems
MASCOT	Matrix science
Mehrkanalpipetten 10, 100, 300 $\mu$ L	Eppendorf
Multipette Plus	Eppendorf
Peristaltikpumpe Minipuls 3	Gilson
pH Elektrode InLab <sup>®</sup> 423	Mettler Toledo



---

Pipetten 2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 $\mu\text{L}$	Gilson
Quantity One 4.4	Biorad
Schüttelmischer	Janke & Kunkel
Spannungsquelle elvi 18	LS Laborservice
Spannungsquelle EPS 1001	Amersham
Spannungsquelle EPS 301	Amersham
Spannungsquelle EPS 601	Amersham
Spektralphotometer U-1100	Hitachi
Spektralphotometer UV-2401 PC	Shimadzu
Thermomixer KTM 100 RP	HLC
Thermoschüttler Vortemp	Uni Equip
Tight-fit Homogenisator Eurostar digital	IKA
Trans-Blot SD	Bio-Rad
Ultraschallbad TK 52 H	Bandelin
Vakuum Konzentrator Univapo 150 H	Uni Equip
Vakuum Pumpe Unijet II	Uni Equip
Voyager DE Pro Massenspektrometer	Applied Biosystems
Waage H 54	Mettler
Waage R 200 D	Sartorius
Wasseraufbereitungssystem Simplicity	Millipore
Wasserbad F3	Haake
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge pico	Heraeus
Zentrifuge RC 28 S	Sorvall
Zentrifuge RC 5 B	Sorvall
Zentrifugenrotor A-4-44	Eppendorf
Zentrifugenrotor F 45-30-11	Eppendorf
Zentrifugenrotor GS 3	Sorvall
Zentrifugenrotor SS 34	Sorvall

## 4.2 Verbrauchsmaterial

96-Loch Platte, Polypropylen	Greiner 651201
Glasperlen 425-600 microns	Sigma G-8772
Klebefolie für 96-Loch Platte	Greiner 676070

---

Membranfilter RC 58, 0,2 $\mu$ M	Roth 5987
Multiscreen-R4, 0,4 $\mu$ M hydrophilic LCR	Millipore Mar4N0410
Membrane, Glass-filled PP-plate	
Papierfilter 110	Schleicher & Schuell 311610
Parafilm	Roth H951
Rotilabo-Blottingpaper	Roth CL67.1
Rotilabo-Blottingpaper	Roth CL75.1
Sequi-Blot PVDF Membran	Bio-Rad 162-0182
ZipTip, C <sub>18</sub>	Millipore ZTC18M960
ZipTip, C <sub>4</sub>	Millipore

## 4.3 Chemikalien

Aceton, technisch	Chemikalienausgabe des FB Chemie
Acetonitril	Roth 4722
Acrylamid, 30%ige wässrige Lösung	Roth 3037
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40%ige wässrige Lösung)	Roth A515
Adenosin-5'-triphosphat (Na-Salz)	Sigma A-3377
Aktivkohle	Roth 5963
Ammoniumbicarbonat	Fluka 09832
Ammoniumchlorid	Roth 5470
Ammoniumchlorid, <sup>15</sup> N	Cambridge Isotope Laboratories
Ammoniummolybdat	Sigma A-7302
APS	Fluka 9915
Bisacrylamid, 2%ige wässrige Lösung	Roth 3039
Bis-Tris	Fluka 14880
Bleinitrat	Roth HN32
Borsäure	Roth 6943
Bromphenolblau	Fluka 18030
Cobaltchlorid	Chemikalienausgabe des FB Chemie
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva 35050
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka 27186
Cytochrom C (Pferd)	Fluka 30397
DDM	Calbiochem 252718

---

---

Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich D5637-1G
Digitonin	Calbiochem 300410
	Applichem A 1905
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka 60353
DTT	Roth 6908
Eisensulfat	Chemikalienausgabe des FB Chemie
Essigsäure	Roth 3738
Ethanol, technisch	Chemikalienausgabe des FB Chemie
Formaldehyd	Roth 4979
Glutaraldehyd	Roth 4995
Glycerin	Roth 7530
Glycin	Roth 3908
HEPES	AppliChem A1069
Iodacetamid	Sigma 16125
Kaliumacetat	Fluka 60034
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth 3904
Katalase	Sigma C-9322
Kupfersulfat	Merck 1.02790
Magnesiumchlorid	Merck A494533
Magnesiumsulfat	Roth P027
Manganchlorid	Fluka 6354.2
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe des FB Chemie
NaEDTA	Roth 8043
Natriumacetat	Roth 8560
Natriumcarbonat	Roth A135
Natriumfluorid	Sigma S-1504
Natriumhydroxid	Roth 6771
Natriumthiosulfat	Fluka 72048
NBT	Fluka 74030
Pefablock SC	Biomol 50985
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem 524627
Pro-Q <sup>®</sup> Diamond Phosphoprotein Blot Stain Kit	Molecular Probes P-33356
Pro-Q <sup>®</sup> Diamond Phosphoprotein Gel Stain	Molecular Probes P-33300
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma P8340
ProteoMass <sup>™</sup> Protein MALDI-MS Calibration Kit	Sigma-Aldrich MS-CAL3
Reactive Brown 10	Sigma R0385-25G
Roti <sup>®</sup> -Block	Roth A151
Roti <sup>®</sup> -Blot	Roth P039

---

---

Roti <sup>®</sup> -Blue	Roth A152
Roti <sup>®</sup> -Lumin	Roth P078
Roti <sup>®</sup> -Nanoquant	Roth K880
Salzsäure	Merck 317
SCAVEGR <sup>™</sup>	Merck 317
SDS	Roth 2326
Sequazyme <sup>™</sup> Peptide Mass Standard Kit	PE Biosystems P2-3143-00
Silbernitrat	Roth 7908
Sorbit	Roth 6213
TEMED	Roth 4995
Tricin	Roth 6977
Trifluoressigsäure	Fluka 91701
Tris	Roth 4855
Trypsin, porc	Promega V5111
Tween 20	Roth 9127
Zinksulfat	Merck 2695101
$\alpha$ -Cyano-p-Hydroxyzimtsäure	Sigma C-2020
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma M-6250
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Merck 8.17010

---

## 4.4 Anzucht und Haltung von *Chlamydomonas reinhardtii*-Kulturen

Kulturen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, genauer deren Zellwand-defiziente Mutante cw 15, (Fiedler et al., 1995) werden von der Sammlung für Algenkulturen in Göttingen bezogen. Diese Kulturen befinden sich in Schrägagarröhrchen und werden zunächst zum Animpfen von Vorkulturen verwendet. Die Vorkulturen werden in je 100 mL entweder eines HS Mediums oder eines TAP Mediums (Harris, 1989) mit Zusatz von Ampicillin angezogen und befinden sich in 1 L Erlenmeyerkolben, die unter Dauerbelichtung durch drei Tageslicht-Leuchtstoffröhren (Osram L 10W/827) mit 60 rpm bei 20°C geschüttelt werden, um ein Absetzen der Zellen auf dem Boden zu vermeiden. Die Flaschen sind dabei mit luftdurchlässigen Gazestopfen verschlossen. Die Zeit, bis eine Kultur hochgewachsen ist, beträgt etwa zwei Wochen, allerdings können Kulturen auch wesentlich länger, bis zu zwei Monate, auf diese Weise überdauern. Hierbei wird das TAP Medium mit Antibiotikum nur etwa alle 8 Wochen, also nach jeder vierten Passage, eingesetzt. Diese Behandlung verhindert einen Befall der Kulturen mit Bakterien. Einen Pilzbefall zu verhindern ist in der Praxis auf lange Zeit gesehen nicht möglich. Ein Ausplattieren der befallenen Kultur auf Agarplatten aus TAP Medium mit 1,5% (w/v) Agar und das Animpfen neuer Vorkulturen ist die eine, das Bestellen neuer Stammkulturen die andere mögliche Maßnahme bei starkem Pilzbefall.

Die eigentliche Anzucht zur Zellernte findet in 5 L Glasflaschen statt, in denen sich jeweils 5 L entweder HS (photoautotrophe Anzucht) oder TAP (photomixotrophe Anzucht) Medium, diesmal ohne Antibiotikum, befindet. Die Kulturen werden in einem zwölfstündigen Rhythmus belichtet, wobei am Anfang der Anzucht immer eine Belichtungsphase steht. Die Kulturen werden außerdem mit Luft, bei einem Teil der Experimente unter Zugabe von 4 % (v/v) CO<sub>2</sub>, durchströmt und langsam gerührt, wiederum um ein Absetzen der Zellen zu verhindern. Die Wachstumsdauer dieser Kulturen beträgt drei Tage. Zu weiteren Details der Anzucht siehe Dissertation von Jürgen Meyer (Meyer zu Tittingdorf, 2004).

---

TAP-Medium	Tris	20,0 mM
	Natriumacetat	7,35 mM
	Essigsäure	0,1 % (v/v)
	NH <sub>4</sub> Cl	7,0 mM
	MgSO <sub>4</sub>	0,04 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,035 mM
	Hutner-Spurenelemente	0,1 % (v/v)
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,7 µM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,0 µM
HS-Medium	NH <sub>4</sub> Cl	94,5 mM
	MgSO <sub>4</sub>	0,17 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,09 mM
	Hutner-Spurenelemente	0,1 % (v/v)
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,28 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,29 mM
Hutner-Spurenelemente	Na <sub>2</sub> EDTA	50,0 g
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22,0 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	11,4 g
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	5,06 g
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4,99 g
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,61 g
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1,57 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,10 g

Alle Komponenten zur Herstellung der Spurenelementelösung werden getrennt in H<sub>2</sub>O dest. gelöst und, mit Ausnahme des EDTAs, gemischt. Die Lösung wird zum Sieden erhitzt, dann wird das gelöste EDTA langsam zugegeben. Sobald das Gemisch auf etwa 70° C abgekühlt ist, wird der pH Wert mit KOH auf 6,7 eingestellt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Volumen mit H<sub>2</sub>O dest. auf einen Liter eingestellt. Die grünliche Lösung wird mit Luft durchsprudelt. Es bildet sich im Verlauf einiger Stunden ein rot-bräunlicher Niederschlag, der abfiltriert wird. Man erhält eine klare violette Lösung, die bei 4° C gelagert wird.

---

## 4.5 Präparation von Chloroplasten und Mitochondrien aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die in dieser Arbeit verwendete Mutante cw 15 der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt im Gegensatz zum Wildtyp keine starre Zellwand. Aus diesem Grund hat die Mutante nicht die für *Chlamydomonas reinhardtii* typische Tröpfchenform, sondern ist kugelförmig. Dieses Defizit in der Zellwandbildung ermöglicht einen relativ sanften Aufschluss der Zellen durch das Schütteln mit Glasperlen (Erikson et al., 1995), der eine Untersuchung der ansonsten durch den Zellaufschluss beschädigten oder zerstörten supramolekularen Proteinstrukturen wie z.B. der OXPHOS-Superkomplexe erlaubt.

Hierzu werden die Zellen zunächst in GS3 Bechern bei 2700 g 10 Minuten lang abzentrifugiert und die Masse der Zellernte festgestellt. Ab diesem Moment wird durchgängig bei 4°C bzw. auf Eis und möglichst zügig gearbeitet. Die relativ weichen Pellets werden mit einem weichen Pinsel und Aufschlusspuffer, je 2 mL pro Gramm Algenpellet, resuspendiert. Die Algen aus je einem GS3 Becher werden in SS34 Röhrchen überführt und mit je 6 mL Glasperlen pro 3 mL Algensuspension eine Minute lang auf dem Schüttlermischer (Janke & Kunkel), Stärkenregler auf Einstellung „4 Uhr“ geschüttelt. Auf diese Weise werden die Zellwände aufgebrochen, die Organellen bleiben jedoch größtenteils intakt. Der Erfolg des Aufschlusses wird im Lichtmikroskop kontrolliert. Die aufgeschlossenen Algen werden mit zusätzlichen 20 mL Aufschlusspuffer von den Glasperlen abdekantiert, mit einer Gelloader-Pipettenspitze abgesaugt und in ein neues SS34 Röhrchen gegeben. So wird nach und nach die gesamte Algenernte aufgeschlossen. Es folgen zwei identische Zentrifugationsschritte von drei Minuten bei 2.000 g. Dabei wird für die zweite Zentrifugation der Überstand der ersten verwendet. Alle Pellets werden anschließend vereinigt. Sie enthalten die Chloroplasten. Der Überstand aus der zweiten Zentrifugation wird nun für zehn Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Das Pellet enthält eine angereicherte Fraktion von Mitochondrien mit Verunreinigungen durch Chloroplasten und Zellkerne. Eine Charakterisierung dieser Fraktionen durch 2D PAGE findet sich in den Kapiteln 5.1 und 5.2. Die Chloroplasten- wie auch die

---

Mitochondrien-Pellets werden mit einem Glasstab und wenig Aufschlusspuffer vorsichtig resuspendiert. Eine Menge von 10  $\mu\text{L}$  wird zur Bestimmung des Chlorophyll- bzw. Proteingehalts entnommen und der Rest zum Schutz der Proben während des Gefrierens mit 10 % (w/v) Glycerin versetzt. Anschließend werden die Proben aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Aufschlusspuffer:	D-Sorbit	250 mM
	MnCl <sub>2</sub>	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Tris	40 mM
	pH Wert wird mit Salzsäure auf 7,8 eingestellt	
	Pefablock	500 $\mu\text{M}$
	Iodacetamid	500 $\mu\text{M}$
	Na <sub>2</sub> EDTA	2 mM
	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	5 mM
	BSA	0,01 % (w/v)
	DTT	10 mM

## 4.6 Präparation von Mitochondrien aus dem Gehirn von *Rattus norvegicus*

Zur Untersuchung altersabhängiger quantitativer Veränderungen im Muster der Atmungskettenkomplexe und -superkomplexe im Rattengehirn stehen insgesamt neun Tiere aus drei Altersgruppen zur Verfügung. Die Gewebeproben wurden der AG Dencher von Herrn Prof. Goto von der Universität Toho, Japan zur Verfügung gestellt. Die Ratten wurden im Alter von 5, 17 oder 31 Monaten getötet und das Gehirn noch vor Ort entnommen und für den Transport schockgefroren. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, dürfen die Präparationsmethoden nicht voneinander abweichen. Aus diesem Grund wurde für die Präparation das bereits von Reifschneider (Reifschneider, 2006) angewandte Verfahren der Mitochondrienisolierung gewählt, obwohl eine Änderung in den



---

Zentrifugationsschritten möglicherweise eine Verbesserung in Ausbeute und Reinheit der Proben bedeutet hätte.

Es wird durchgehend auf Eis gearbeitet, alle verwendeten Lösungen sowie Zentrifugen und Rotoren werden auf 4 °C gekühlt. Die Gehirnhälften werden aufgetaut und gewogen. Sie wiegen jeweils etwa ein Gramm. Die vierfache Menge an Lösung 1 (w/w) wird zu jeder Hirnhälfte dazugegeben und das Gewebe im tight-fit Homogenisator (B. Braun Teflon/Glas Homogenisator „S“ mit 2 mL Maßskala) zerkleinert (9 Hübe bei 500 rpm). Die Homogenisate werden in 15 mL Bluecap Röhrchen gefüllt und bei 1300 g drei Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände, in denen sich die Mitochondrien befinden, werden vorsichtig in ein SS34 Zentrifugenröhrchen überführt. Hierbei wird darauf geachtet, keine Reste des weichen Sediments mit zu pipettieren. Die Sedimente werden mit jeweils 1 mL Lösung 1 resuspendiert und erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Die Überstände dieser zweiten Zentrifugation enthalten wieder Mitochondrien und werden jeweils mit dem entsprechenden Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt. Die Sedimente werden noch einmal mit 1 mL Lösung 1 resuspendiert und ein drittes Mal zentrifugiert, die Überstände mit denen der vorherigen Zentrifugationen der gleichen Probe vereinigt. Die Überstände werden, um die Mitochondrien nun zu sedimentieren, bei 17.000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Die so gewonnenen Proben werden mit jeweils 1-2 mL Lösung 2 resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Proteingehalt der Proben wird mit Roti-Nanoquant<sup>®</sup> bestimmt (siehe Kapitel 4.14.3).

Lösung 1	Hepes	5 mM
	Saccharose	350 mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM
	pH Wert 7,4 wird eingestellt	
	Pefablock	0,5 mM
Lösung 2	Saccharose	320 mM
	Es wird bidest. H <sub>2</sub> O verwendet.	



---

Ein Solubilisierungsansatz enthält neben der zu untersuchenden Probe und der Digitoninlösung einen Solubilisierungspuffer. Die Methoden der Solubilisierung unterscheiden sich jedoch bei *Chlamydomonas reinhardtii* und Ratte, da im Fall der Proben aus *Rattus norvegicus* das Protokoll von Reifschneider (Reifschneider, 2006) übernommen wurde, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können.

Zur nativen Solubilisierung der Membranproteine ist es notwendig, bei 4° C zu arbeiten, da die Komplexe außerhalb ihrer natürlichen Membranumgebung empfindlich gegenüber höheren Temperaturen sind. Alle verwendeten Lösungen, der Schüttler und die Zentrifuge werden vorgekühlt.

Zur Solubilisierung der Proben aus *Chlamydomonas reinhardtii* wird ein Solubilisierungsansatz mit 0,25 mg Chlorophyll pro mL hergestellt, der 1,5% (w/v) Digitonin enthält. Dieser Ansatz wird gründlich gemischt und 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wird der Ansatz für eine Stunde bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, was bei dem verwendeten Zentrifugenrotor F 45-30-11 20.817 g entspricht. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und für die Gelelektrophorese verwendet.

Die Solubilisierung von Proben aus *Rattus norvegicus* beginnt damit, die Probe mit Solubilisierungspuffer zu waschen. Sie wird dann bei 20.000 g zehn Minuten lang zentrifugiert, danach wird der Puffer von der Probe abpipettiert. Das Detergens zu Protein Verhältnis ist 8 g/g für alle Proben. Solubilisiert wird 30 Minuten unter Schütteln, es folgt eine zehnminütige Zentrifugation bei 20.817 g. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und für die Elektrophorese verwendet.

Solubilisierungspuffer für	Glycerin	20% (w/v)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Magnesiumsulfat	10 mM
(2fach):	Tricin	40 mM
	ε-Aminocapronsäure	400 mM
	DTT	10mM
Solubilisierungspuffer für <i>Rattus</i>	Glycerin	20% (w/v)
<i>norvegicus</i> (Arnold et al., 1998a)	Hepes	33,33 mM
1,11fach*:	Kaliumacetat	166,67 mM
	Glycerin	11,1% (w/v)

\*Bei gering konzentrierten Proben wird ein 2fach konzentrierter Puffer hergestellt.

---

Als Massenstandard zur Elektrophorese im BN Gelsystem wird zusätzlich zu einer kommerziell erhältlichen Proteinmischung (HMW) ein Solubilisat aus Rinderherzmitochondrien benutzt. Die apparenten Massen der hier enthaltenen Proteinkomplexe und Superkomplexe sind bekannt (Schägger and Pfeiffer, 2000) und können daher für eine genauere Bestimmung der apparenten Molmassen der Gelbanden herangezogen werden. Die Rinderherzmitochondrien wurden von Oliver Schicht präpariert (Schicht, 2003) und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein Solubilisierungsansatz besteht aus 1% (w/v) Digitonin, 0,33% (w/v) Mitochondriensuspension und einem Puffer, der in der Endkonzentration 30 mM Hepes, 150 mM Kaliumacetat und 10% (w/v) Glycerin enthält. Der pH-Wert des Puffers wird mit Natronlauge auf 7,4 eingestellt. Zum Auftrag auf ein BN Gel werden pro Spur etwa  $100\text{ }\mu\text{g}$  Protein zur Solubilisierung eingesetzt.

## 4.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamidgele (PA-Gele) werden in der Proteinbiochemie zur Trennung und Reinigung, sowie zu Charakterisierung von Proteinen aller Art verwendet. Sie werden aus den Monomeren Acrylamid, das eine, und Bisacrylamid, das zwei Kohlenstoff-Kohlenstoff Doppelbindungen besitzt, in einer radikalischen Reaktion polymerisiert. Bisacrylamid sorgt so für eine Vernetzung der ansonsten linearen Polymere. Ein PA-Gel wird durch zwei Größen charakterisiert, die festlegen, welche Porengröße das Gel hat. Die Totalacrylamidkonzentration  $T$  ist hierbei die Summe der Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid, der Vernetzungsgrad  $C$  ist der Anteil von Bisacrylamid an der Totalacrylamidkonzentration. Beide Werte werden üblicherweise in % (w/v bzw. w/w) angegeben.

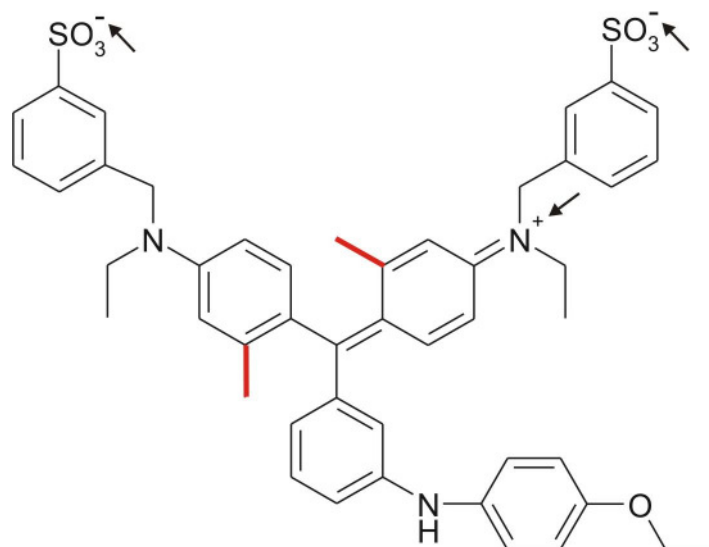
Denaturierende und so genannte „native“, also die natürliche Struktur der Proteine erhaltende Polyacrylamidgele werden zur Auftrennung und Gewinnung nicht nur von Proteinen, sondern auch deren Komplexen oder -superkomplexen eingesetzt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Gele werden selbst hergestellt und spätestens eine Woche nach dem Gießen verwendet. Bei hohen Raumtemperaturen über  $25^{\circ}\text{C}$  wird die

---

Gelelektrophorese in einem klimatisierten Raum betrieben, die blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN PAGE) generell bei 4 °C. Es wird zur Herstellung jedes Gels bidest. H<sub>2</sub>O benutzt. Soll ein Gel für die massenspektrometrische Analyse verwendet werden, wird MilliQ H<sub>2</sub>O verwendet.

#### 4.8.1 Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die BN PAGE nach Schagger (Schagger and von Jagow, 1991) wird verwendet, um große Proteinkomplexe und -superkomplexe bis in den Megadalton-Bereich hin aufzutrennen. Ihren Namen verdankt diese Methode dem verwendeten blauen Farbstoff Coomassie G-250 (nicht zu verwechseln mit Coomassie R-250, siehe Abbildung 4.2), der während der Elektrophorese die hydrophoben Oberflächenanteile von Proteinen und Proteinkomplexen bedeckt und so ihre native Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur erhält.

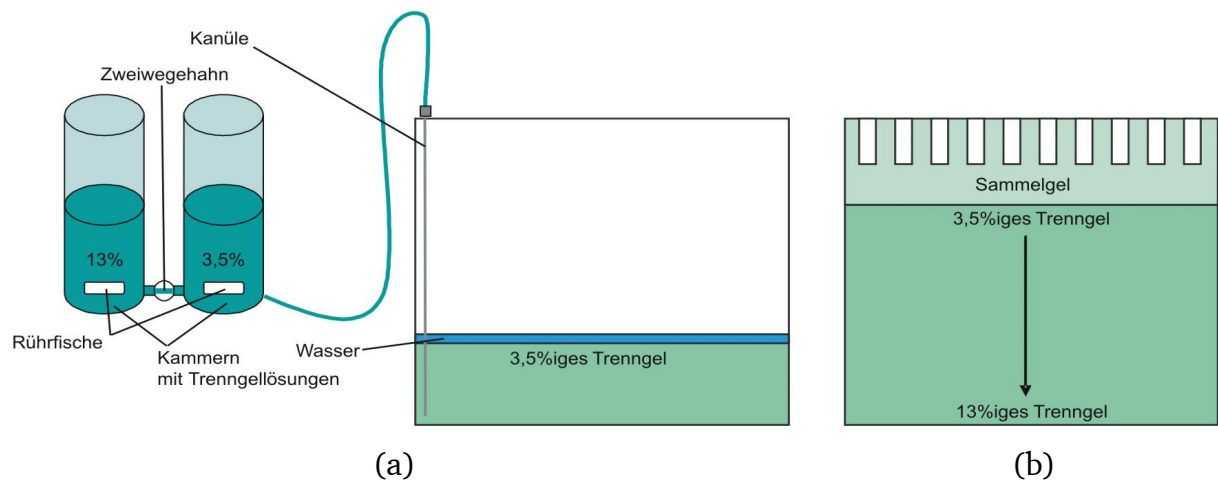


Vernetzungsgrad konstant bleibt. Dieser Gradient liegt üblicherweise in einem Bereich zwischen 3,5% und 20%, und wird entsprechend der molekularen Masse der aufzutrennenden Komplexe gewählt. Die in dieser Arbeit am häufigsten benutzten analytischen BN Gele zur zweidimensionalen Gelelektrophorese besitzen einen Gradienten von 3,5% bis 13% T, präparative BN Gele einen Gradienten von 5% bis 8%. Für ein Pipettierbeispiel eines analytischen BN Gels siehe Tabelle 4.1.

**Tabelle 4.1: Zusammensetzung der Gellösungen** für die Herstellung eines analytischen BN Gels von 1,5 mm Dicke. Die Lösungen werden nach dem Pipettieren, ehe TEMED und APS dazugegeben werden auf 4°C gekühlt, um eine vorzeitige Polymerisierung zu verhindern.

	Sammelgellösung	Trenngellösung 1	Trenngellösung 2
T;C [%]	3;3	3,5;3	13;3
Gellösung AB [mL]	0,54	1,18	4,40
Gellösung A [mL]	0,10	0,18	0,63
Gelpuffer [mL]	2,67	5,00	5,00
Wasser [mL]	4,6	8,6	4,9
TEMED [ $\mu$ L]	6,5	7,5	4,9
APS (10%, w/v) [ $\mu$ L]	65,2	75,0	49,1

Gele für die zweidimensionale Gelelektrophorese haben die Abmessungen 14 cm x 16 cm x 1,5 mm (BxHxT). Präparative Gele sind gleich groß, aber 3 mm dick. Sie erlauben eine Auftrennung von größeren Mengen an Probenmaterial, eignen sich aber weniger gut für die Bildanalyse als die dünnere Variante, da die Auflösung etwas schlechter ist. Ist von einer Probe nur wenig Material vorhanden oder soll beispielsweise lediglich die Aktivität eines Komplexes überprüft werden, wobei eine geringere Trennleistung des Gels ausreicht, werden sogenannte Minigele verwendet, die ebenfalls 1,5 mm dick aber nur 8 cm x 8 cm groß sind. Sie haben eine geringere Auflösung, bieten aber die Vorteile, dass die Gelelektrophorese schneller durchzuführen ist und eine geringere Probenmenge eingesetzt werden kann. Für Proben pflanzlichen Ursprungs werden generell Bis-Tris gepufferte Gele verwendet (BT), für tierische Proben Imidazol haltige Gele (Schägger, 2001).



**Abbildung 4.3: Schematische Darstellung eines blau-nativen Polyacrylamidgels.**

(a) Der Gießvorgang zur Erstellung eines Trenngels mit linear ansteigendem Acrylamidgradienten. (b) Fertiges Gel.

Das Trenngel wird zuerst gegossen. Hierzu werden die beiden miteinander über einen Zweiwegehahn verbundenen Rührkammern mit den zwei Trenngellösungen gefüllt, wobei die niedrigerprozentige Lösung immer in das vordere (in Abb. 4.2 das rechte Gefäß) gehört. Der Raum zwischen den Gelplatten wird etwa 2 mm hoch mit Wasser gefüllt. Das Wasser liegt nach dem Gießvorgang über dem Trenngel, schützt es einerseits vor Oxidation und sorgt andererseits für eine glatte Kante. Damit die Gellösungen nicht vor dem Gießen polymerisieren, wird die ganze Apparatur im Kühlschrank bei 4° C betrieben. Der Magnetrührer wird angeschaltet, dann gleichzeitig der Zweiwegehahn geöffnet und die Peristaltikpumpe aktiviert. Diese Pumpe befindet sich am Schlauch, der zur Kanüle führt, und ist in Abb. 4.2 nicht dargestellt. Die Gellösung mit dem höheren Acrylamidgehalt enthält zusätzlich Glycerin, auf diese Weise wird ein Gel mit einem linearen Gradienten von der geringeren zur höheren Konzentration gegossen.

Sobald die Rührkammern leer sind, wird die Peristaltikpumpe abgestellt, die Kanüle vorsichtig entfernt und das Gel aus dem Kühlschrank genommen. Es polymerisiert jetzt innerhalb einer Stunde bei RT aus, anschließend wird das Sammelgel gegossen. Hierfür wird das Wasser über dem Trenngel abgegossen und die Sammelgellösung eingefüllt. Ein Taschenformer mit breiten Zinken wird in die Apparatur gesteckt und das Gel wiederum bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis es vollständig

---

auspolymerisiert ist. Anschließend wird der Taschenformer entfernt, die Geltaschen werden mit Gelpuffer gefüllt (3-fach verdünnt, so dass die Konzentration der Inhaltsstoffe im Puffer und im Gel identisch sind) und bis zur Verwendung aufrecht stehend bei 4° C gelagert. Ein BN-Gel kann bis zu einer Woche gelagert werden.

Zum Beladen wird der Gelpuffer aus den Taschen gesaugt und diese mit Kathodenpuffer 0,02% zu etwa zwei Dritteln gefüllt, dann wird vorsichtig die mit Auftragspuffer gemischte Proteinprobe hinein pipettiert (pro 20 µg Protein, gemessen vor der Solubilisierung, wird 1 µL Auftragspuffer verwendet). Als Größenstandards dienen bei der BN PAGE ein HMW Marker (siehe Tabelle 4.2) und/oder ein Digitonin-Solubilisat aus Rinderherzmitochondrien (siehe Kapitel 4.7).

**Tabelle 4.2: Zusammensetzung des High Molecular Weight Massenstandards.**

Die Proteinmischung wird bei blau-nativen Gelen als Maßstab zur Bestimmung der apparenten Molmassen eingesetzt.

HMW	Protein	Molekularmasse [kDa]
Massenstandard:	Thyroglobulin, Schwein	669
	Ferritin, Pferd	440
	Katalase, Rind	232
	Lactat Dehydrogenase, Rind	140
	Albumin, Rind	66

Beim Einfüllen des jeweiligen Kathodenpuffers 0,02% (BT oder Imidazol) in die Pufferkammer ist zu beachten, dass die Proben nicht aus den Geltaschen ausgespült werden. Die Elektrophorese wird mit einer maximalen Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 15 mA gestartet. Nachdem die Laufront das Trenngel erreicht hat, werden die begrenzenden Werte auf 500 V und 15 mA eingestellt. Nach etwa der Hälfte des Gellaufs wird der Kathodenpuffer gewechselt. Es wird jetzt ein Puffer mit zehnfach geringerer Konzentration an Coomassie benutzt. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Laufront das Reservoir des Anodenpuffers erreicht.



---

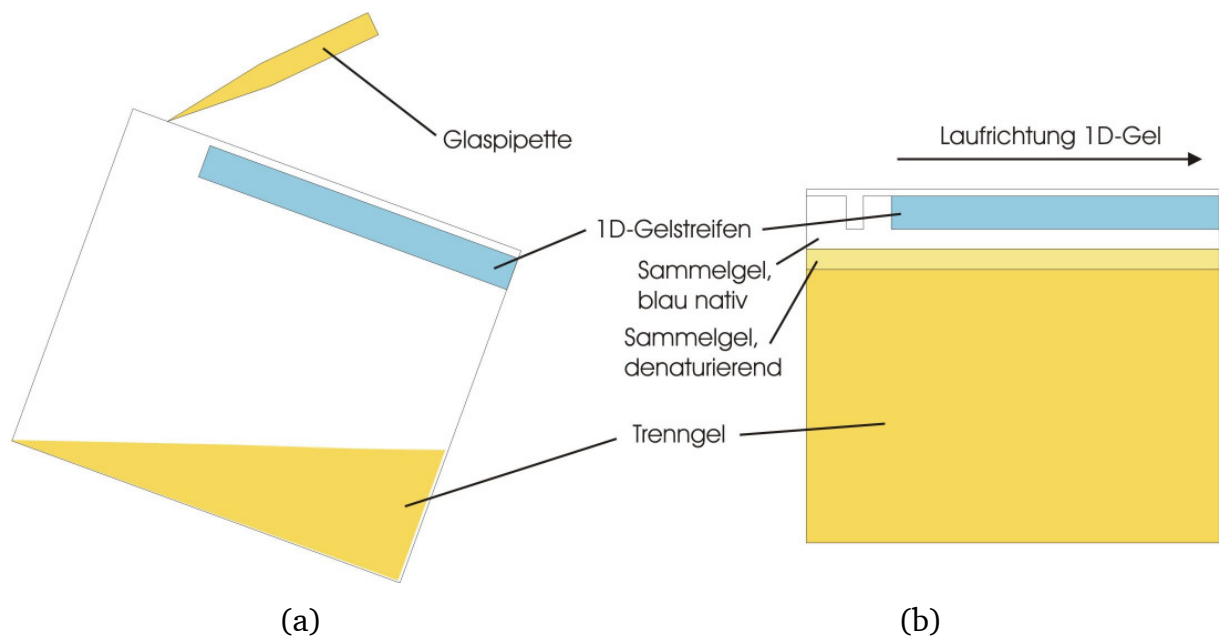
Gelpuffer BT, 3fach:	Bis-Tris	150 mM
	$\epsilon$ -Aminocaprönsäure	600 mM
	Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.	
Gelpuffer BT mit Glycerin, 3fach:	Bis-Tris	150 mM
	$\epsilon$ -Aminocaprönsäure	600 mM
	Glycerin	60% (w/v)
	Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.	
Gelpuffer Imidazol, 3fach:	$\epsilon$ -Aminocaprönsäure	1,5 M
	Imidazol	75 mM
	Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.	
Gelpuffer Imidazol mit Glycerin, 3fach:	$\epsilon$ -Aminocaprönsäure	1,5 M
	Imidazol	75 mM
	Glycerin	60% (w/v)
	Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.	
Auftragspuffer	$\epsilon$ -Aminocaprönsäure	500 mM
	Bis-Tris	50 mM
	Coomassie G-250	5% (w/v)
	Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.	
Anodenpuffer BT	Bis-Tris	50 mM
	Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.	
Kathodenpuffer BT, 0,02%	Coomassie G-250	0,02% (w/v)
	Tricine	50 mM
	Bis-Tris	15 mM
Kathodenpuffer BT, 0,002%	Coomassie G-250	0,002% (w/v)
	Tricin	50 mM
	Bis-Tris	15 mM
Anodenpuffer Imidazol	Imidazol	25 mM
	Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt.	
Kathodenpuffer Imidazol 0,02%	Tricin	50 mM
	Imidazol	7,5 mM
	Coomassie G-250	0,02% (w/v)
Kathodenpuffer Imidazol 0,002%	Tricin	50 mM
	Imidazol	7,5 mM
	Coomassie G-250	0,002% (w/v)

---

---

#### 4.8.2 2D-BN/SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese besteht aus der in Kapitel 4.8.1 beschriebenen blau-nativen ersten, und einer SDS-haltigen zweiten Gel-Dimension (Schägger et al., 1994). Das anionische Detergens SDS bindet, abhängig von der Hydrophobizität der Proteine, etwa im Verhältnis 1,4 g zu 1 g an die Proteine (Voet et al., 2002) und denaturiert sie, während gleichzeitig deren Eigenladung maskiert wird. Dieses Verfahren erlaubt es, die in der BN PAGE erhaltenen Proteinkomplex-Banden in einzelne Proteine aufzutrennen. So wird eine Identifikation mittels Massenspektrometrie oder anhand des speziellen Musters eines Komplexes möglich.



**Abbildung 4.4: Herstellung eines 2D BN/SDS Polyacrylamidgels.** (a) Gießen des Trenngels. (b) Fertiges Gel. Unter einem BN Gelstreifen befinden sich zwei unterschiedliche Schichten Sammelgel. Das obere entspricht in seiner Zusammensetzung der des 1D Streifens, das untere ist ein denaturierendes SDS Sammelgel. Zuunterst befindet sich das denaturierende SDS-Trenngel.

Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgt wie unter Punkt 4.8.1 beschrieben. Es werden immer große, 1,5 mm dicke Gele verwendet, die 13% Totalacrylamid enthalten. Die Spur der Probe, die in einer zweiten Gel-Dimension untersucht werden soll, wird zunächst vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten. Der Gelstreifen wird mit einer Lösung von 1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1% (w/v) SDS bedeckt und eine Stunde lang inkubiert. Dabei wird die Lösung nach einer halben Stunde

gewechselt. Anschließend wird der Gelstreifen mit bidest. H<sub>2</sub>O abgespült und zwischen zwei Glasplatten der Elektrophoreseapparatur positioniert. Die Apparatur wird nun so weit zusammengebaut, dass das 2D Gel gegossen werden kann, und mit Wasser gefüllt. Auf diese Weise wird der Aufbau auf Dichtigkeit geprüft, und es werden eventuell vorhandene Reste des  $\beta$ -Mercaptoethanols ausgespült, die eine Polymerisation der Gelmatrix stören würden. Das Trenngel, das denaturierende und das native Sammelgel werden in dieser Reihenfolge in die Apparatur gegossen (siehe Abbildung 4.4) und mit Wasser überschichtet. Jede Schicht Gel muss auspolymerisieren, ehe die nächste gegossen wird. Luftblasen unter dem 1D Streifen werden vermieden, indem man die Apparatur beim Gießen schräg hält und langsam gießt. Sobald das obere Sammelgel gegossen ist, wird ein einzelner Taschenformer neben den 1D-Gelstreifen in die Gellösung gesteckt. Auf diese Weise entsteht eine Tasche, in die 2  $\mu$ L LMW Massenstandard (siehe Tabelle 4.3) aufgetragen wird.

Die Elektrophorese wird am Anfang auf 50 V begrenzt. Hat die Lauffront das Trenngel erreicht, wird die Spannung auf 110 V erhöht. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Lauffront auf ganzer Breite das untere Pufferreservoir erreicht hat.

Trenngelpuffer, 3fach	Tris	3,0 M
	SDS	0,15% (w/v)
	Glycerin	30% (w/v)
	Der pH-Wert wird auf 8,25 eingestellt.	
Sammelgelpuffer, denaturierend	Tris	3,0 M
	SDS	0,15% (w/v)
	Der pH-Wert wird auf 8,25 eingestellt.	
Sammelgelpuffer, blau nativ	Siehe Kapitel 4.8.1	
Anodenpuffer	Tris	0,1 M
	Der pH-Wert wird auf 8,9 eingestellt.	
Kathodenpuffer	Tris	0,1 M
	Tricin	0,1 M
	SDS	0,05% (w/v)

**Tabelle 4.3: Zusammensetzung des Low Molecular Weight Massenstandards.** Er enthält sieben Proteine bekannter Masse, die in der SDS-Gelelektrophorese als Standard zur Bestimmung der apparenten Molmasse dienen.

LMW Massenstandard:	Protein	Molekularmasse [kDa]
	Phosphorylase b	94
	Albumin	67
	Ovalbumin	43
	Carboanhydrase	30
	Trypsin-Inhibitor	20
	$\alpha$ -Lactalbumin	14

#### 4.8.3 2D BN/BN PAGE

Die zweidimensionale BN/BN PAGE nutzt in beiden Gel-Dimensionen das in Kapitel 4.8.1 beschriebene System, wobei der zweiten Gel-Dimension ein weiteres Detergens, nämlich Dodecylmaltosid (DDM) hinzugefügt wird. Das führt zu einem partiellen Zerfall der großen Proteinsuperkomplexe, und die einzelnen Komponenten können auf diese Weise verglichen werden. Für weitere Details der Methode siehe meine Diplomarbeit (Schwassmann, 2004).

#### 4.8.4 Glycin-SDS PAGE

Die Glycin-SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wird in dieser Arbeit verwendet, um Proteine aus *Rattus norvegicus* für eine anschließende Antikörpermarkierung aufzutrennen, oder um den Erfolg verschiedener Solubilisierungsansätze zu überprüfen. Es werden immer 8 cm x 8 cm große und 0,75 mm dicke Gele verwendet. Das Trenngel enthält 14% Totalacrylamid, das Sammelgel 5%. Für weitere Details zu dieser Art der Gelelektrophorese wie auch Pipettierschemata siehe Seelert (2000) und Schwaßmann (2004).

Sammelgelpuffer (8fach)	Tris	1,0 M
	Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt.	
Trenngelpuffer (4fach)	Tris	3,0 M
	Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt.	

---

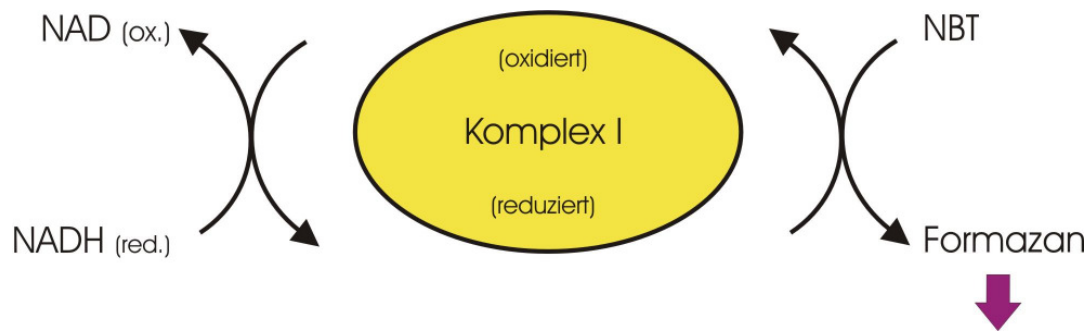
Elektrophoresepuffer	Glycin	0,4 M
	Tris	50 mM
	SDS	0,1% (w/v)
Auftragspuffer	Saccharose	15% (w/v)
	SDS	2,5% (w/v)
	Natriumcarbonat	0,25% (w/v)
	Bromphenolblau	0,04% (w/v)
	DTT	25 mM

## 4.9 In-Gel Aktivitätstests

Die eingesetzten Aktivitätstests der Atmungskettenkomplexe basieren auf Redoxreaktionen, deren eines Produkt jeweils ein farbiger Niederschlag ist, wenn der getestete Atmungskettenkomplex aktiv ist. Solche Tests werden aus zwei unterschiedlichen Gründen durchgeführt. Zum einen sollen sie Aufschluss darüber geben, ob der betreffende Komplex in seiner nativen Struktur erhalten und somit funktionsfähig ist. Das ist wichtig, wenn beispielsweise eine Strukturanalyse des Komplexes durchgeführt wird oder seine Vollständigkeit geprüft werden soll. Zum anderen kann so die Position eines Atmungskettenkomplexes in einem BN Gel der ersten Dimension genau bestimmt werden, wenn keine 2D Analyse durchgeführt werden soll. Dies ist vor allem dann hilfreich, wenn von dem entsprechenden Komplex nur eine geringe Menge vorhanden ist, die im Gel der zweiten Dimension von anderen Proteinen überlagert wird. Hier erkennt man anhand der Farbreaktion eindeutig die Lage der gesuchten Komplexe.

### 4.9.1 NADH Dehydrogenase Aktivität von Komplex I

Die hier beschriebene Nachweisreaktion beruht auf der Reduktion von NBT durch den NADH-Dehydrogenase-Teil des Komplex I. Es entsteht ein lilafarbener Niederschlag aus Formazan an der Oberfläche des Gels, das die Lokalisierung von aktivem Komplex I im Gel anzeigt (Grandier-Vazeille and Guerin, 1996).



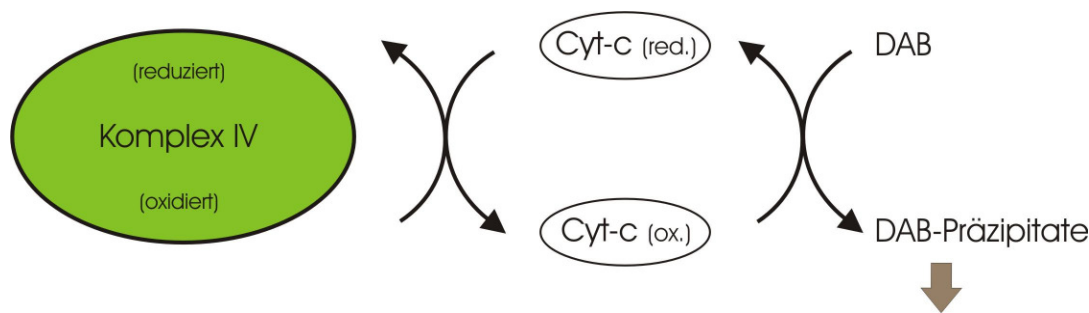
**Abbildung 4.5: Redoxreaktion zur Bestimmung der Aktivität von NADH Dehydrogenase (Komplex I).** Die Testlösung, mit der das BN Gel inkubiert wird, enthält NADH. An den Stellen im Gel, die aktiven Komplex I enthalten, oxidiert dieser das NADH zu NAD. Umgekehrt wird außerdem NBT zu Formazan reduziert. Formazan fällt als lilafarbenes Präzipitat aus.

Das NBT wird zunächst in der Hälfte des Endvolumens bidest. H<sub>2</sub>O gelöst, dann werden die Puffersubstanzen Tris und Glycin dazugegeben. Der pH-Wert wird mit Salzsäure auf 7,4 eingestellt. Danach erst wird das  $\beta$ -NADH in die Lösung gegeben. Der für den Test vorgesehene Teil eines BN Gels, für gewöhnlich eine Spur mit 100 bis 200  $\mu$ g Protein, wird ausgeschnitten und im Testpuffer inkubiert. Nach etwa zehn Minuten färben sich die Banden, die aktive NADH Dehydrogenase enthalten, violett. Nach einer Stunde wird die Färbung beendet. Der Gelstreifen wird in 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure fixiert.

Testpuffer:	Tris	100 mM
	Glycin	768 mM
	NBT	489 $\mu$ M
	$\beta$ -NADH	100 $\mu$ M
	Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.	

#### 4.9.2 Cytochrom-c Oxidase Aktivität von Komplex IV

Um die Aktivität der Cytochrom-c Oxidase nachzuweisen, wird der zu testende Gelstreifen mit einer Lösung inkubiert, in der sowohl Cytochrom-c als auch 3,3' Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) enthalten sind. Komplex IV oxidiert das Cytochrom-c, welches wiederum DAB oxidiert. Letzteres bildet bräunliche Präzipitate aus DAB-Oxiden und -Indaminen an der Geloberfläche, die das Vorhandensein aktiver Komplexe IV anzeigen (Zerbetto et al., 1997).



**Abbildung 4.6: Redoxreaktion zur Bestimmung der Aktivität von Cytochrom-c Oxidase (Komplex IV).** In der Gegenwart von Komplex IV wird reduziertes Cytochrom c oxidiert, welches dann DAB zu farbigen Präzipitaten oxidiert.

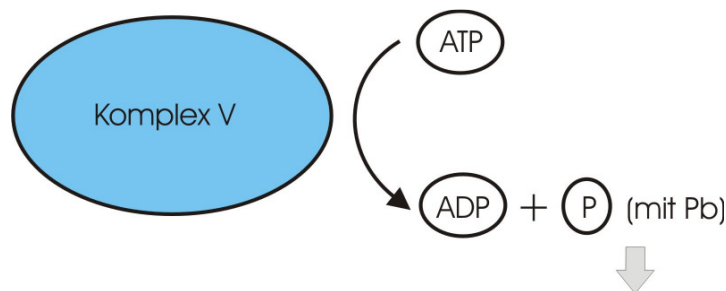
Alle Bestandteile des Testpuffers werden eingewogen und der pH-Wert geprüft. Er sollte bei 7,4 liegen und wird bei Bedarf mit etwas HCl eingestellt. Die zu untersuchende Spur des BN-Gels wird ausgeschnitten und in der Lösung inkubiert. Nach ca. einer Stunde erkennt man anhand von bräunlichen Banden die Lage von aktivem Komplex IV. Die Färbedauer kann auf bis zu 10 Stunden verlängert werden, bis der gewünschte Grad der Färbung erreicht ist. Danach wird der Gelstreifen mit Wasser abgespült und in 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure fixiert.

Testpuffer:	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,85 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40,15 mM
	DAB	0,5 mg/mL
	Katalase	20 Units/mL
	Saccharose	75 mg/mL
	Cytochrom c	0,5 mg/mL
Durch den Kaliumphosphatpuffer stellt sich ein pH Wert von 7,4 ein.		

#### 4.9.3 ATPase Aktivität von Komplex V

Dieser Test nach (Zerbetto et al., 1997) zeigt die Position aktiver ATPase im BN Gel. Das in der Testlösung vorhandene ATP wird durch die ATPase in ADP und Phosphat gespalten. Das Phosphat bildet mit den ebenfalls in der Testlösung vorhandenen Bleiionen ein schwerlösliches Salz, das an den entsprechenden Stellen im Gel ausfällt. Da die Spaltung von ATP von der im F<sub>1</sub> Teil der ATP-Synthase lokalisierten

$\beta$ -Untereinheit katalysiert wird und von einer Protonen pumpenden Aktivität unabhängig funktioniert, ist diese Nachweismethode alleine aber kein Beweis für das Vorhandensein einer kompletten funktionsfähigen ATP-Synthase, denn abgespaltene  $F_1$  Teile reagieren ebenfalls. Aus diesem Grund wird immer auch die apparente Masse des untersuchten Komplexes im Gel betrachtet.



**Abbildung 4.7: Der Test der ATPase Funktion** beruht auf der Dephosphorylierung von ATP durch den  $F_1$  Teil von Komplex V. Das freie Phosphat fällt mit den in der Lösung enthaltenen Bleiionen als schwerlöslicher Niederschlag an den Stellen im Gel aus, an denen ATP hydrolysiert wird, wo sich somit Komplex V oder freier  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase befindet.

Für den Testpuffer werden zuerst die Puffersubstanzen und Magnesiumsulfat gelöst, der pH-Wert eingestellt und anschließend ATP und Bleinitrat zugegeben. Das zu untersuchende Stück BN Gel wird ausgeschnitten und im Testpuffer unter leichtem Schütteln inkubiert, bis sich nach ein bis zwei Stunden weiße Banden gebildet haben, die die Position aktiver ATPase anzeigen. Die Detektion erfolgt im Gelscanner. Es ist notwendig, eine schwarze Platte unter das Gel zu legen, um einen ausreichend guten Kontrast zu den weißen Präzipitatbanden zu erzeugen.

Testpuffer:	Tris	35 mM
	Glycin	270 mM
	MgSO <sub>4</sub>	14 mM
	ATP	0,8 mM
	Blei(II)nitrat	0,0175% (w/v)
	Der pH-Wert wird auf 7,8 eingestellt.	



---

## 4.10 In-Gel Proteinfärbungen

Je nachdem, wieviel Protein auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen wurde, und welche Untersuchungen sich anschließen, werden unterschiedliche Färbeprotokolle zur Visualisierung der Proteine im Gel gewählt. Eine detailliertere Beschreibung der quantitativen Färbemethoden findet sich in Kapitel 2.1.1 der Einleitung.

In der Regel werden Gele der ersten Dimension mit Coomassie gefärbt. Gele der zweiten Dimension, die quantitativ ausgewertet werden sollen, werden mit Sypro Ruby, die übrigen Silber-gefärbt.

### 4.10.1 Coomassie Färbung nach Görg

Die modifizierte Coomassie Färbung von Proteinen (Görg et al., 1978; Rexroth et al., 2003) wird in dieser Arbeit zum Anfärben von blau-nativen Gelen verwendet. Die Färbung ist quantitativ, reversibel, und kompatibel mit einer anschließenden MALDI-Analyse. Das zu färbende Gel wird in eine Schale mit Färbelösung gelegt und so lange unter leichtem Schütteln gefärbt, bis die Banden deutlich sichtbar sind. Anschließend wird das Gel in Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund fast klar ist. Ein Nachfärben oder nachträgliches Entfärben ist möglich. Coomassie-gefärbte blau-native Gele können nicht mehr für die 2D-Analyse verwendet werden, da die Proteine durch den Prozess der Färbung im BN Gel fixiert werden und nicht mehr in ein 2D Gel einlaufen.

Färbelösung	Coomassie R-250	1,8 mM
	Essigsäure	10% (v/v)
	Kupfersulfat	20 mM
	Methanol, technisch	45% (v/v)
Entfärbelösung	Essigsäure	10% (v/v)
	Kupfersulfat	20 mM
	Methanol, technisch	25% (v/v)

---

Für die Färbelösung wird zuerst der Coomassie-Farbstoff in Methanol und das Kupfersulfat in der Essigsäure gelöst, anschließend werden beide Lösungen mit Wasser auf das halbe Endvolumen aufgefüllt und im Verhältnis 1 zu 1 gemischt.

Gele werden zur Färbung für etwa eine halbe Stunde in der Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden sie so lange in der Entfärbelösung geschüttelt, bis der Hintergrund annähernd klar ist. Färbung sowie Entfärbung können wiederholt werden.

#### 4.10.2 Roti<sup>®</sup> Blue Färbung

Die Roti<sup>®</sup> Blue Färbung ist eine kolloidale Coomassie Färbung, die laut Hersteller eine Sensitivität von 30 ng pro Bande erreichen kann. Sie liegt somit im Bereich der Silberfärbung nach Blum. In dieser Arbeit wird sie hauptsächlich bei Gelen verwendet, die geblottet wurden, um die Transfereffizienz zu überprüfen, sowie für verschiedene Gelsorten der ersten Dimension.

Färbelösung	Roti <sup>®</sup> Blue 10fach Konzentrat	20% (v/v)
	Methanol, technisch	20% (v/v)
Entfärbelösung	Methanol, technisch	25% (v/v)

Beide Lösungen werden mit bidest H<sub>2</sub>O angesetzt. Das Gel wird in der Färbelösung mindestens 2 Stunden oder länger, bis zu 15 Stunden, unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird es in der Entfärbelösung so lange gewaschen, bis der Hintergrund klar ist.

#### 4.10.3 Silbernitrat Färbung

Die Silbernitrat Färbung nach Blum (Blum et al., 1987; Rabilloud et al., 1988) ist eine Färbung, die mit einer anschließenden MALDI-Analyse kompatibel ist. Die Sensitivität liegt bei 5 bis 30 ng Protein pro Bande, ist also relativ hoch. Der dynamische Bereich ist mit nur einer Größenordnung relativ klein, daher wird die Färbung nicht für quantitative Analysen eingesetzt.

Das zu färbende Gel wird zweimal 30 Minuten in Fixierer 1 und anschließend dreimal 20 Minuten in Fixierer 2 inkubiert. Dem Gel wird dadurch Wasser entzogen und es

---

wird kleiner. Nach dem Fixieren wird das Gel für etwa eine Minute in den Sensitivierer gelegt, bis es seine ursprüngliche Größe wieder angenommen hat, und anschließend gründlich mit Wasser gewaschen. Das Gel wird in die Silbernitratlösung gelegt und 20 Minuten leicht geschüttelt. Nachdem Reste der Silbernitratlösung sorgfältig abgespült wurden, wird das Gel in der Entwicklerlösung solange inkubiert, bis die bräunliche Färbung die gewünschte Intensität erreicht hat. Der Färbeprozess wird durch die Stopplösung angehalten. Das Gel kann anschließend in wenig Lagerlösung aufbewahrt werden.

Fixierer 1	Methanol, technisch	50% (v/v)
	Essigsäure	12% (v/v)
Fixierer 2	Ethanol, technisch	50% (v/v)
Sensitivierer	Natriumthiosulfat	0,81 mM
Silberlösung	Silbernitrat	11,77 mM
	Formaldehyd	0,0263% (v/v)
Entwicklerlösung	Natriumcarbonat	566,1 mM
	Natriumthiosulfat	0,02 mM
	Formaldehyd	0,0175% (v/v)
Stopplösung	Essigsäure	10% (v/v)
Lagerlösung	Essigsäure	1% (v/v)

Es wird grundsätzlich bidest. H<sub>2</sub>O oder eine bessere Qualität verwendet.

#### 4.10.4 SYPRO<sup>®</sup> Ruby Färbung

Diese Fluoreszenzfärbung ist hoch sensitiv und quantitativ, sie wird bei Gelen der zweiten Dimension zur vergleichenden quantitativen Analyse eingesetzt. Die Methode wird eingehend beschrieben in Kapitel 2.1.1 der Einleitung.

Fixierer	Methanol, technisch	10% (v/v)
	Essigsäure	7% (v/v)
Färbelösung	SYPRO <sup>®</sup> Ruby	unverdünnt
Waschlösung	Methanol, technisch	10% (v/v)
	Essigsäure	7% (v/v)

---

Das Gel wird zuerst für mindestens drei Stunden fixiert und anschließend in die Färbelösung gegeben. Der Fluoreszenzfarbstoff ist nicht lichtstabil und bleicht relativ schnell aus, aus diesem Grund findet der drei- bis vierstündige Färbeprozess sowie die weitere Behandlung des gefärbten Gels unter Lichtausschluss statt. Nach dem Färben wird das Gel zehn Minuten lang in der Waschlösung entfärbt. Vor der Fluoreszenzdetektion wird das Gel mit bidest. H<sub>2</sub>O abgespült. Die Detektion erfolgt in der LAS-3000 bei einer Anregungswellenlänge von 460 nm (blaue LEDs) und einem LP Filter ab 605 nm.

#### 4.10.5 Pro-Q<sup>®</sup> Diamond Färbung

Ähnlich wie SYPRO<sup>®</sup> Ruby ist auch Pro-Q<sup>®</sup> Diamond ein Fluoreszenzfarbstoff. Er soll laut Hersteller spezifisch an phosphorylierte Proteine binden und es so ermöglichen, alle Phosphoproteine in einem 2D Gel oder auf einer Westernblotmembran auf einmal zu markieren. Hierbei soll die Nachweisgrenze bei 8 bis 16 ng pro Bande liegen. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, muss zum Vergleich immer noch ein Bild des gleichen Gels oder Blots, diesmal mit SYPRO<sup>®</sup> Ruby gefärbt, aufgenommen werden. Proteine, die im Verhältnis mit Pro-Q<sup>®</sup> Diamond stärker angefärbt werden als mit SYPRO<sup>®</sup> Ruby, sind Phosphoproteine.

Ein Gel wird zunächst mindestens zweimal 30 Minuten lang unter leichtem Schütteln in Fixierer inkubiert und anschließend dreimal für zehn Minuten mit Wasser gewaschen. Für die Färbung selbst wird das Gel für 90 Minuten in die unverdünnte Färbelösung gelegt und wiederum leicht geschüttelt. Ab jetzt müssen alle weiteren Schritte unter Abdunklung erfolgen, da der Farbstoff nicht lichtstabil ist. Das Gel wird dreimal für 30 Minuten mit der Waschlösung entfärbt. Nach zweimaligem kurzen Waschen mit Wasser wird die Fluoreszenz im LAS-3000 bei 520 nm (grüne Dioden) angeregt und mit einem LP 575 Filter detektiert.

Eine Westernblot Membran wird mit Methanol benetzt und mit der Proteinseite nach unten für zehn Minuten in den Fixierer gelegt. Anschließend wird sie viermal für einige Minuten in Wasser gewaschen. Es folgt eine 15 minütige Inkubation unter

---

leichtem Schütteln in der Färbelösung. Nachdem überschüssiger Farbstoff dreimal für einige Minuten mit der Waschlösung abgespült wurde, wird die Membran zur Detektion getrocknet. Diese erfolgt in der LAS-3000 nach einer Fluoreszenzanregung bei 520 nm (grüne Dioden) mit einem LP 575 Filter.

Beide Methoden erfordern es, das Gel/den Blot entweder gar nicht oder mit einer Pinzette anzufassen. Ansonsten besteht die Gefahr, dass sich auch die angefassten Stellen färben.

Fixierer Gel	Methanol, technisch	50% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Färbelösung Gel	Pro-Q <sup>®</sup> Diamond Gel Stain	unverdünnt
Fixierer Blot	Methanol, technisch	10% (v/v)
	Essigsäure	7% (v/v)
Färbelösung Blot	Pro-Q <sup>®</sup> Diamond Blot Stain	0,1% (v/v)
	Komponente A	
	Pro-Q <sup>®</sup> Diamond Blot Stain	auffüllen
	Komponente B	
Waschlösung	Natriumacetat	50 mM
	Acetonitril	20% (v/v)
	Der pH Wert wird mit Essigsäure auf 4,0 eingestellt.	

## 4.11 Westernblots und Antikörpermarkierung

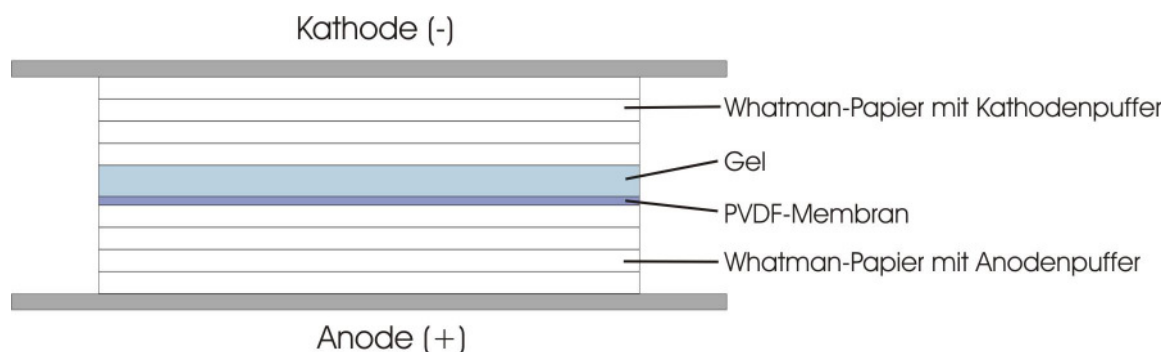
Die Idee, Proteine aus Gelen auf eine Membran zu übertragen (sogenannter Westernblot), stammt von mehreren Wissenschaftlern, die diese etwa gleichzeitig verwirklichen konnten (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979). Der Westernblot ermöglicht es, die Auftrennung der Proteine, wie sie durch das Gel erreicht wurde, beizubehalten, und gleichzeitig die Proteine auf seiner Oberfläche direkt zugänglich zu machen. Diese räumliche Zugänglichkeit ermöglicht es, gezielt nach bestimmten Eigenschaften an diesen Proteinen zu suchen. Das wichtigste Werkzeug hierbei ist die Markierung der Proteine mit Antikörpern. In dieser Arbeit werden Antikörper u.a.

---

verwendet, um Proteine der Atmungskettenkomplexe zu markieren. Des Weiteren können die Proteine auch direkt mit speziellen Farbstoffen markiert werden, wie z.B. mit dem in dieser Arbeit verwendeten Pro-Q<sup>®</sup> Diamond, das Phosphoproteine spezifisch anfärbt. Für den Westernblot werden sowohl Gele der ersten als auch der zweiten Dimension verwendet.

#### 4.11.1 Semi-Dry Blotting

Das Semi-Dry (halb trockene) Blotting (Kyhse-Andersen, 1984) stellte sich im Laufe der Arbeit als die zuverlässigste Methode des Blottens dar, sowohl im Bezug auf die Transfereffizienz als auch auf die Anfälligkeit für Bedienungsfehler. Im Vergleich zur Tank-Blot Methode (Schäfer, 2007) lieferte sie bei geringerem Materialaufwand deutlich bessere Ergebnisse. Hier werden die verwendeten Puffer in spezielle, saugfähige Papierblätter (Whatman-Papier) aufgenommen und so direkt auf Gel bzw. PVDF-Membran gebracht (siehe Abbildung 4.8). Die Proteine im Gel sind vor und während der Elektrophorese mit SDS assoziiert worden, was ihnen eine negative Nettoladung gibt. Wird nun das Blotten durch das Anlegen einer elektrischen Spannung gestartet, wandern die Proteine in Richtung der Anode, so dass sie sich auf der PVDF-Membran sammeln. Die durch die Elektrophorese erreichte Auftrennung bleibt hierbei erhalten, wobei die Bandenschärfe auf dem Blot bei zunehmender Geldicke etwas abnimmt. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 15 Minuten in Elektrophoresepuffer equilibriert. Acht Blätter saugfähiges Papier und eine PVDF Membran werden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Je die Hälfte der Papierblätter wird in Anoden und Kathodenpuffer gelegt, die PVDF-Membran wird mit Methanol benetzt. Der Aufbau erfolgt wie in Abbildung 4.8 gezeigt, Luftblasen werden vermieden. Gel und Membran dürfen nur mit einer Pinzette berührt werden. Die anzulegende Stromstärke errechnet sich aus den Dimensionen des Gels und beträgt 2 mA pro cm<sup>2</sup> bei 1,5 mm dicken Gelen und 1 mA pro cm<sup>2</sup> bei 0,75 mm dicken Gelen. Geblottet wird für 45 Minuten bei einer Spannung von 50 V. Anschließend wird der Blot entweder gefärbt (siehe Kapitel 4.10.5 und 4.11.4) oder die Proteine werden mit Antikörpern markiert.



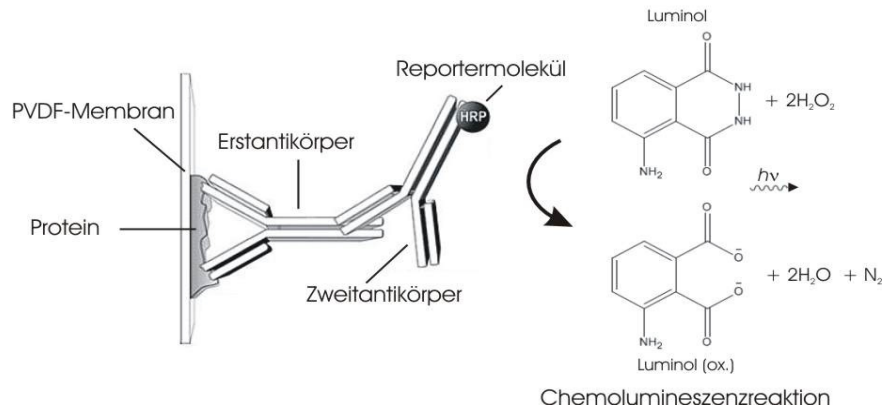
**Abbildung 4.8: Aufbau eines Semi-Dry Blots.** Die einzelnen Komponenten werden wie im Bild gezeigt übereinander geschichtet. Kathode und Anode sind so im Gerät angebracht, dass die verschiedenen Schichten während des Blotting Vorgangs aufeinander gedrückt werden. Die angelegte Spannung führt zu einer Bewegung der Proteine in Richtung Anode, so dass sie sich auf dem Blot wiederfinden.

Elektrophoresepuffer	Siehe Kapitel 4.8.3	
Kathodenpuffer	Roti <sup>®</sup> -Blot 2K	10% (v/v)
	Methanol, technisch	20% (v/v)
Anodenpuffer	Roti <sup>®</sup> -Blot 2A	10% (v/v)
	Methanol, technisch	5% (v/v)

#### 4.11.2 Antikörpermarkierung

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunologischen Nachweise bestehen aus zwei Schritten. Zuerst werden die Proteine, die nachgewiesen werden sollen, spezifisch mit dem Erstantikörper markiert. Dieser Erstantikörper kann dabei aus verschiedenen Tieren stammen, wie aus Mäusen oder Kaninchen. In einem zweiten Schritt werden dann die Erstantikörper von einem zweiten, der gegen den Organismus, aus welchem der Erstantikörper stammte, gerichtet ist, erkannt und markiert (siehe Abbildung 4.9). Der Zweitantikörper trägt als Reportermolekül die Meerrettichperoxidase (HRP, englisch: horseradish peroxidase). Diese oxidiert unter Zugabe von Wasserstoffperoxid Luminol. Bei dieser Reaktion entsteht unter anderem 3-Aminophthalat in einer energetisch angeregten Form. Beim Zurückfallen in den Grundzustand emittiert das Molekül ein Photon, das im LAS-3000 detektiert wird (Albrecht et al., 1990). Natürlich sind auch andere Formen der Detektion, beispielsweise durch Farb- oder Fluoreszenzreaktionen möglich, entsprechende Antikörper stehen zur Verfügung. Die

Methode der HRP/Luminol Detektion hat sich jedoch als zuverlässig und genau erwiesen, weshalb von mir keine anderen Nachweismethoden angewendet wurden.



**Abbildung 4.9: Funktionsweise des Western Blots mit HRP zur Chemolumineszenz-Detektion.**  
(modifiziert nach: wikipedia.org; Western Blot)

Nach dem Blotten wird die PVDF-Membran zuerst für mindestens eine Stunde in Roti<sup>®</sup>-Block inkubiert. Die Block-Lösung sättigt freie Bindungsstellen an der PVDF-Membran ab, was eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran verhindert. Für die Antikörpermarkierungen werden zwei unterschiedliche Puffersysteme benutzt, TBS oder PBS. Sie unterscheiden sich in der verwendeten Puffersubstanz. Für den Nachweis von Phosphoproteinen werden Tris-gepufferte Lösungen verwendet, für den Nachweis von Atmungskettenkomplexen Lösungen mit einem Phosphatpuffer. Der Erstantikörper wird in TBS oder PBS Puffer verdünnt (die Verdünnung wird für den jeweiligen Antikörper angepasst, siehe Kapitel 5) und der Blot eine Stunde damit inkubiert. Bei einigen Antikörpern kann diese Inkubationszeit auch verlängert werden (siehe Kapitel 5). Der Blot wird anschließend fünfmal für zehn Minuten mit TTBS oder PBST Puffer gewaschen und dann für eine Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach weiteren vier zehnminütigen Waschschritten mit TTBS oder PBST und einem mit TBS oder PBS ist der ungebundene Zweitantikörper entfernt und der Blot fertig zur Detektion.



---

TBS Puffer (Nachweis von	Tris	25 mM
Phosphoproteinen)	NaCl	150 mM
	KCl	3 mM
TTBS Puffer	Tween 20	0,1% (v/v) in TBS Puffer
PBS (Nachweis von	NaCl	137 mM
Atmungskettenkomplexen)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,9 mM
	KCl	2,7 mM
PBST	Tween 20	0,5% (v/v) in PBS Puffer

#### 4.11.3 Chemolumineszenz-Detektion

Der mit Antikörpern markierte Blot wird auf das Epi-Tray der LAS-3000 gelegt und mit einer frisch angesetzten 1 zu 1 Mischung von Roti<sup>®</sup>-Lumin Komponenten 1 und 2 benetzt. Die Detektion erfolgt in der LAS-3000, es wird eine Inkrementmessung mit Intervallen von 30 Sekunden oder einer Minute durchgeführt. Die Aufnahme dauert etwa 10 Minuten, bis die stärksten Signale den Sättigungsbereich erreichen. Zur Auswertung wird jeweils das Bild benutzt, das die längste Belichtungszeit hatte, ohne die Sättigung zu erreichen. Auf diese Weise wird die beste Quantifizierbarkeit gewährleistet, da der Unterschied zwischen schwachen und starken Signalen hier maximal ist.

#### 4.11.4 Färbung mit Reactive Brown

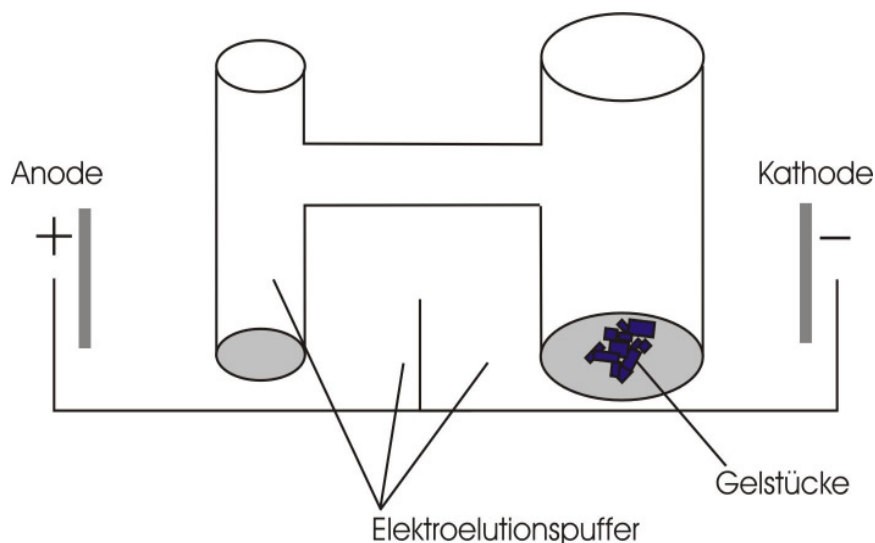
Reactive Brown ist ein Farbstoff, der, wie auch Coomassie, ursprünglich zum Färben von Textilien verwendet wurde. Er wird in dieser Arbeit benutzt, um Proteine auf Blots vor der Antikörpermarkierung zu färben, etwa um die erfolgreiche Übertragung der Proteine vom Gel auf den Blot zu zeigen. Hierbei liegt die Nachweisgrenze bei 1 bis 2 ng pro Bande (Yonan et al., 2005).

Für die Färbung werden 0,05% (w/v) Reactive Brown in bidest. H<sub>2</sub>O gelöst. Der Blot wird einige Sekunden in der Lösung inkubiert und anschließend mit Wasser abgespült. Proteinspots sind jetzt lila gefärbt. Der Farbstoff kann durch eine kurze Inkubation des Blots in 0,1 M NaOH wieder entfernt werden. Anschließend kann der Blot für die Immunodetektion genutzt werden.

---

## 4.12 Elektroelution

Um die durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine oder Proteinkomplexe für strukturbiochemische Untersuchungen nutzen zu können, müssen diese wieder aus der Gelmatrix gelöst werden. Hierzu bietet sich unter anderem die Elektroelution an. Ihr Prinzip ist dem der Elektrophorese ähnlich: Die Proteine wandern bedingt durch ihre Assoziierung mit einem negativ geladenen Detergens (SDS oder Coomassie) im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Es wird nur jeweils eine bestimmte Proteinbande ausgestochen und in die Apparatur gelegt. Auf diese Weise wird keine Trennung von verschiedenen Proteinen, wohl aber die Trennung von Gel und Protein erreicht. Das eluierte Protein sammelt sich an der Membran der Anodenseite. Es hat sich gezeigt, dass selbst große Atmungsketten-Superkomplexe die Elektrophorese mit anschließender Elektroelution in ihrer nativen Form überdauern können (Schäfer et al., 2006; Seelert and Krause, 2008).



**Abbildung 4.10: Aufbau der Apparatur zur Elektroelution.** Das zerkleinerte Gel liegt auf einer semipermeablen Membran. Die Apparatur ist mit Puffer gefüllt. Legt man jetzt eine Spannung an, so wandern die Proteine aus dem Gel zur Membran an der Anodenseite der Apparatur und sammeln sich dort.

Der zu eluierende Proteinkomplex wird im blau-nativen Gel identifiziert, entweder anhand des Bandenmusters oder eines Aktivitätstests (siehe Kapitel 4.9) und mit dem Skalpell ausgestochen. Die Bande wird zerkleinert, um eine große Oberfläche zu

---

schaffen und in der Elektroelutionsapparatur auf die Membran an der Kathodenseite gelegt. Es werden hierbei Dialysemembranen mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa benutzt. Die Apparatur wird mit Elektrolytlösung gefüllt und in die ebenfalls mit Elektrolytlösung gefüllte Doppelschale gestellt, an der Anode und Kathode angebracht sind. Die Elektroelution dauert vier Stunden und wird bei 4° C, 75 V und maximal 2 mA durchgeführt. Die eluierten Proteine auf der Membran der Anodenseite sind immer noch mit Coomassie assoziiert und daher gut an der blauen Färbung erkennbar. Sie werden vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt.

## 4.13 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie von Proteinsuperkomplexen dient deren dreidimensionaler Strukturaufklärung sowie der Klärung ihrer Funktionsweise. Die Elektronenmikroskopie dieser Arbeit wurden von Frau Dr. Eva Schäfer, Dr. Holger Seelert oder Frau Dr. Tina Suhai durchgeführt. Die Proteinproben für die Elektronenmikroskopie werden aus präparativen blau-nativen Gelen gewonnen. Es handelt sich hierbei um den Superkomplex S1 (siehe Kapitel 5.2) und freien Komplex I der Atmungskette aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Der Superkomplex/Komplex wird entweder durch Diffusion, indem man das fein zerkleinerte Gel mit wenig Flüssigkeit überschichtet und über Nacht schüttelt, oder durch Elektroelution (siehe Kapitel 4.12) aus der Gelmatrix gelöst. Dabei werden unterschiedliche Mengen an Digitonin zugesetzt um eine Aggregation zu verhindern. Um sicherzustellen, dass die Superkomplexe bei dieser Prozedur nicht zerfallen oder denaturiert werden, wird eine Mini-BN PAGE mit anschließendem Aktivitätstest für Komplex I und, im Fall des Superkomplexes, für den ebenfalls beteiligten Komplex IV an allen Proben durchgeführt (siehe Kapitel 4.8.1, 4.9.1, 4.9.2). Hat der eluierte Superkomplex/Komplex seine apparente Masse beibehalten und zeigt er weiterhin eine gute Aktivität, werden die Proben im Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main elektronenmikroskopisch untersucht.

---

Nach einer Negativ-Kontrastierung mit Uranylacetat werden Einzelpartikelbilder aufgenommen. Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich in den entsprechenden Dissertationen (Schäfer, 2006; Suhai, 2008a).

## 4.14 Weitere analytische Methoden

### 4.14.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl der *Chlamydomonas* Kulturen erfolgt zur Überprüfung des Wachstums. Ein untypisches Wachstumsverhalten ist ein Hinweis auf veränderte Kulturbedingungen oder Verunreinigungen der Anzucht, beispielsweise durch Pilz- oder Bakterienbefall.

Es wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet, in der definierte Volumina einer Probe unter dem Mikroskop betrachtet werden können. Auf diese Weise wird die Zellzahl in der Probe errechnet. Die *Chlamydomonas*-Probe wird vor der ersten Zentrifugation entnommen. 1 mL der Algensuspension wird mit 40  $\mu$ L einer 3%igen (v/v) Glutaraldehydlösung versetzt. Das Glutaraldehyd bewirkt, dass den Algen die Geißeln abfallen und sie sich besser zählen lassen. Bei einer sehr hohen Zelldichte werden die Zählfelder unter dem Mikroskop fotografiert und später auf dem Computermonitor gezählt.

### 4.14.2 Bestimmung des Proteingehalts mit Roti<sup>®</sup>-Nanoquant

Dieses Essay zur Bestimmung des Proteingehalts beruht auf einer Modifikation der Methode nach Bradford (Bradford, 1976; Zor and Selinger, 1996). Es wird in dieser Arbeit verwendet, um den Proteingehalt der Präparationen aus *Rattus norvegicus* zu bestimmen, und hat laut Hersteller eine Nachweisgrenze von 200 ng Protein pro mL gemessener Probe. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 verschiebt, wenn der Farbstoff an ein Protein bindet. Ungebundenes Coomassie liegt bei den in der Arbeitslösung herrschenden Bedingungen in einer kationischen Form vor, die ein

---

Absorptionsmaximum von 470 nm besitzt. Bindet der Farbstoff an ein Protein, geht er in seine anionische Form über und das Absorptionsmaximum verschiebt sich nach 595 nm. Jede Probe und eine Standardreihe mit je zwei Ansätzen pro Messpunkt werden bei 590 nm und 450 nm vermessen. Der Quotient  $A_{590}/A_{450}$  wird gebildet und ermöglicht eine direkte Korrelation von Absorption und Proteinmenge.

Die Arbeitslösung entspricht 20% (v/v) Roti<sup>®</sup>-Nanoquant Stammlösung in Wasser. Jede zu messende Probe wird auf das Volumen 200  $\mu$ L berechnet und mit 800  $\mu$ L Arbeitslösung vermischt. Nach 30 Minuten wird die Probe gemessen. Die doppelte Eichreihe wird mit BSA angesetzt, die eingesetzten Proteinmengen liegen zwischen 0 und 5  $\mu$ g. Die Proteinproben werden in sechs Verdünnungen zwischen 1 zu 200 und 1 zu 2000 jeweils doppelt angesetzt. Der Proteingehalt wird für jede einzelne der Verdünnungen aus den Absorptionswerten errechnet und daraus ein Mittelwert gebildet.

#### 4.14.3 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Alle aus *Chlamydomonas reinhardtii* gewonnenen Proben enthalten sehr viel Chlorophyll, was eine Proteinbestimmung mit Roti-Nanoquant, das den blauen Farbstoff Coomassie G-250 enthält, oder ähnlichen Methoden unmöglich macht, da die Proben stark grün gefärbt sind. Aus diesem Grund wird zur Abschätzung des Proteingehalts auf die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration (Frasch et al., 1980) zurückgegriffen. Wie sich in der Arbeit mit den Algen und mit höheren Pflanzen gezeigt hat, die seit langer Zeit in unserer Arbeitsgruppe betrieben wird, ist das Verhältnis von Chlorophyll zu Protein bei Proben gleicher Art, die auf die gleiche Weise präpariert wurden, konstant. Wird das Präparationsprotokoll jedoch geändert, beispielsweise die Aufschlussmethode, oder wird der untersuchte Stamm gewechselt, muss mit einem veränderten Chlorophyll/Protein Verhältnis gerechnet werden.

Zur Chlorophyllbestimmung werden 40  $\mu$ L der Probe in 10 mL 80%igem (v/v) Aceton gelöst und anschließend filtriert. Die Absorption bei 646 nm und 663 nm wird gegen 80%iges Aceton in einer Küvette mit der Schichtdicke  $d = 1$  cm gemessen. Die Chlorophyllkonzentration ergibt sich dann aus folgender Gleichung:

---

$$[\text{Chlorophyll}] = 4,843 \text{ mM} \cdot A_{646} + 2,007 \text{ mM} \cdot A_{633}$$

## 4.15 MALDI-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie von Proteinen oder Proteinbestandteilen spielt in allen Teilen dieser Arbeit eine wichtige Rolle. Das mir zur Verfügung stehende MALDI-TOF Massenspektrometer wird hierzu für verschiedene Arten von Experimenten eingesetzt. Dieses Massenspektrometer verfügt über einen Stickstofflaser, der gepulstes UV Licht abstrahlt (337 nm Wellenlänge). Die Proteinmoleküle der Probe sind in eine Matrix eingebettet, die dieses UV Licht absorbiert, und die Probenmoleküle ionisiert. Als Matrix geeignet sind die häufig verwendeten Derivate der Zimtsäure, der Benzoesäure oder ähnliche Verbindungen (Beavis and Chait, 1989). Die ionisierten Probenmoleküle werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und können durch zwei Detektoren entweder im linearen oder im Reflektormodus gemessen werden. Der Reflektormodus bietet eine höhere Auflösung aufgrund einer längeren Flugstrecke der Moleküle, im linearen Modus gibt es dafür die Möglichkeit, auch sehr große Proteine massenspektrometrisch zu untersuchen.

Die Masse ganzer Proteine wird bestimmt, um sie mit der in Datenbanken hinterlegten Masse zu vergleichen, und um festzustellen, ob durch eine Isotopenmarkierung im hohen Massenbereich ein sichtbarer Effekt erzielt werden kann.

Mikroproteine wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Kolmar hergestellt. Sie werden mit Hilfe des Massenspektrometers auf ihre Reinheit und die korrekte Synthese hin überprüft.

Verdaute Proteine werden mittels der Methode des Peptide Mass Fingerprinting (siehe Kapitel 2.2) identifiziert, indem die Massen eines tryptischen Verdaus eines Proteins mit denen eines theoretischen Verdaus aus einer Datenbank verglichen werden. Des Weiteren werden unterschiedlich isotopenmarkierte Proteine nach einem tryptischen Verdau gleichzeitig identifiziert und quantifiziert.

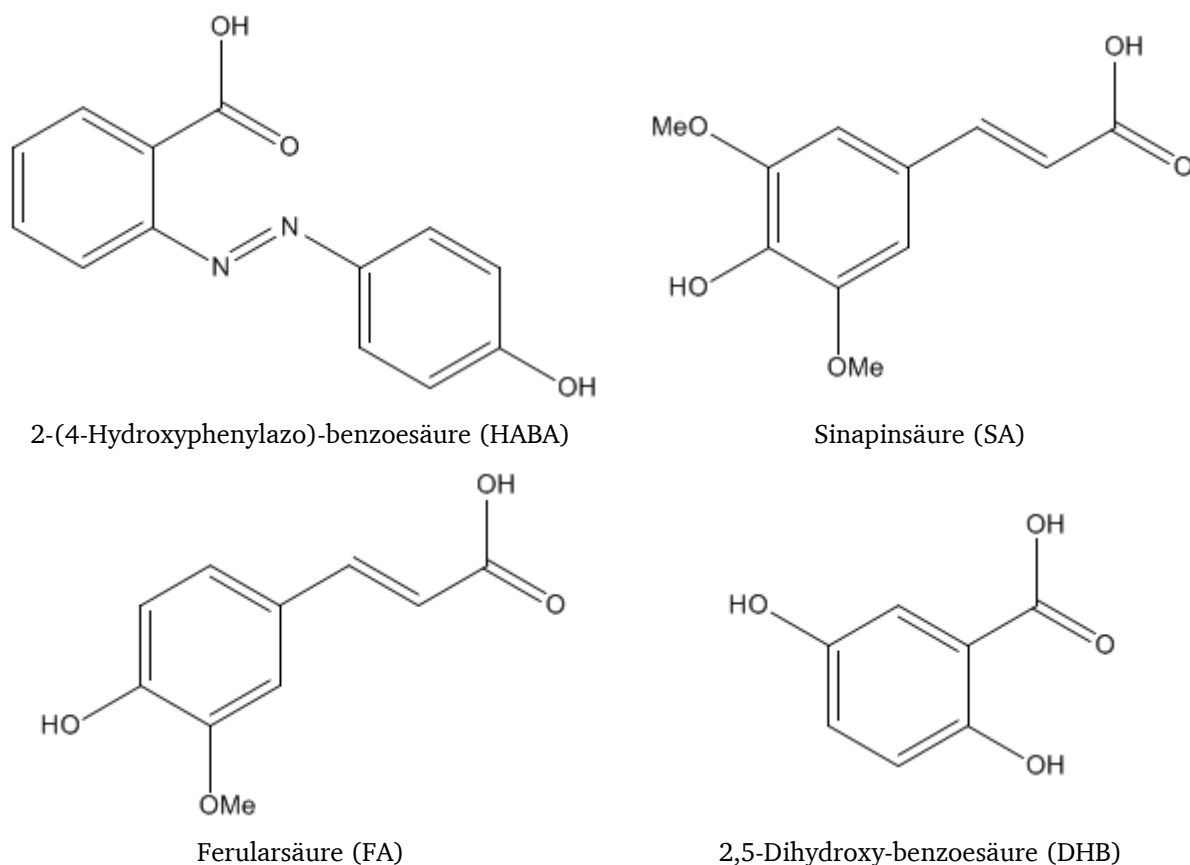
---

#### 4.15.1 Massenspektrometrie von ganzen Proteinen

Ein Protein, welches im Massenspektrometer untersucht werden soll, muss zuerst gereinigt werden, das bedeutet, es muss von anderen Proteinen und Stoffen, welche im Massenspektrum erscheinen könnten, getrennt werden. Detergenzien sollten nicht in der Proteinlösung enthalten sein, ebenso wenig wie Salze. Je besser die Reinheit der Probe, desto höher ist die Qualität des resultierenden Massenspektrums. Um eine ausreichende Reinheit der Probe zu gewährleisten, werden die zu untersuchenden Proteine an einer HPLC aufgereinigt. Für Details zu den Verfahren der Säulenreinigung siehe das entsprechende Kapitel in der Diplomarbeit von Stefan Schmelz (Schmelz, 2006).

Da Proteine sich in ihren Eigenschaften, zum Beispiel im Bezug auf ihre Größe oder Hydrophobizität, stark unterscheiden, werden für jedes Protein verschiedene geeignete Matrices (Beavis and Chait, 1989; Juhasz and Costello, 1993; Mann and Talbo, 1996; Moore, 1997) getestet, um festzustellen, welche für die massenspektrometrische Untersuchung am besten geeignet ist (siehe Abbildung 4.11). Die Matrices werden jeweils in 0,5%igen (w/v) Lösungen aus 50% (v/v) Acetonitril (TFA) und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) angesetzt, im Kühlschrank gelagert und maximal eine Woche lang verwendet.

Das Protein liegt nach der HPLC in einer Lösung vor, die 0,1% (v/v) TFA enthält und zu einem gewissen Anteil aus Acetonitril besteht, je nachdem, wann es von der Säule eluiert wurde. Ein auf diese Weise gereinigtes Protein wird direkt für die Massenspektrometrie verwendet. Stammt es aus einer anderen Quelle, so kann es an C<sub>4</sub>-ZipTips aufgereinigt werden. Das Protein wird hierfür bei niedrigem ACN Gehalt an die Minisäule in der ZipTip Pipettenspitze gebunden, mit 0,5% TFA gespült, und mit einem höheren ACN Anteil von etwa 50% wieder gelöst.



**Abbildung 4.11: Strukturformeln der zur massenspektrometrischen Untersuchung von Proteinen eingesetzten Matrices.**

Die Kalibrierung der Masse erfolgt über einen externen Massenstandard. Das bedeutet, dass Probe und Standard nicht gemischt werden. Als Massenstandard werden verschiedene Proteine des ProteoMass MALDI-MS Calibration Kit benutzt (siehe Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Für die Kalibrierung von Massenspektren eingesetzte Proteine. Es werden jeweils zwei Proteine zur Kalibrierung einer Messung benutzt. Es werden diejenigen Proteine gewählt, deren Masse am ehesten der zu erwartenden Masse der gemessenen Probe entspricht.

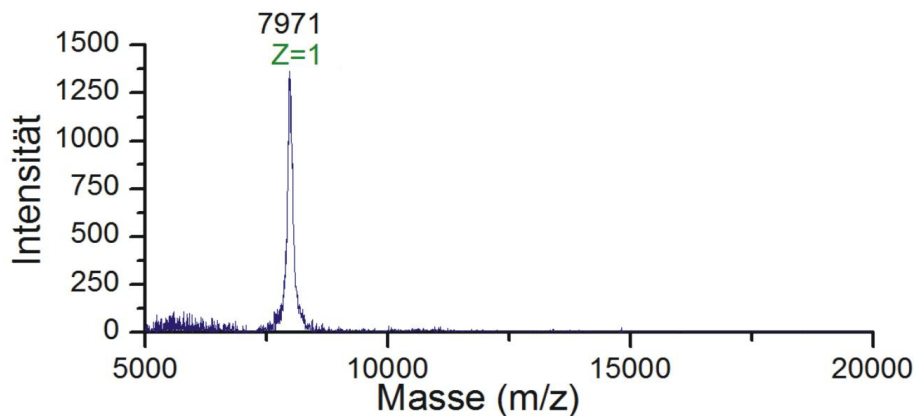
Protein des Massestandards	Masse
Insulin	5.734,51 Da
Cytochrome c	12.361,96 Da
Apomyoglobin	16.952,27 Da
Aldolase	39.211,28 Da
BSA	66.429,09 Da



---

Die einzelnen Proteine werden in der Konzentration 100 pmol pro  $\mu\text{L}$  in 0,1% TFA gelöst. Jeweils zwei Proteine, deren Masse nahe an der des untersuchten Proteins liegt, werden zur Kalibrierung ausgesucht. 0,5  $\mu\text{L}$  der zwei Kalibrierlösungen werden in 24  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Matrixlösung gegeben, und in räumlicher Nähe zur Probe aufgetragen, in der Regel direkt daneben.

Von der Proteinlösung wird ein  $\mu\text{L}$  auf das MALDI-Target aufgetragen. Ein  $\mu\text{L}$  Matrixlösung wird dazugegeben, so dass Protein und Matrixmoleküle kokristallisieren. Das Massenspektrometer wird auf eine Beschleunigungsspannung von 25 kV, eine Grid-Spannung von 90-93%, eine Guidewire-Spannung von 0,1% und eine verzögerte Extraktionszeit (delayed extraction) von 550 bis 750 ns eingestellt. Der Detektor schließt außerdem alle Signale unter 5.000 Da/z aus. Die Messung erfolgt manuell, wobei die Laserintensität vor jeder Messung angepasst wird. Sie wird so eingestellt, dass ein deutliches Signal sichtbar ist. Eine zu geringe Laserintensität führt zu einem schwachen Signal, eine zu hohe zur Fragmentierung des Proteins sowie zum häufigeren Auftreten von mehrfach geladenen Proteinen. Ist die Laserintensität optimiert, werden jeweils 150 Spektren akkumuliert und von diesen akkumulierten Spektren 6 bis 8 aufgenommen und gemittelt. Die Basislinienkorrektur wird mittels der Data Explorer Software durchgeführt. Es haben sich folgende Parameter als sinnvoll erwiesen: Peakwidth 250; Flexibility 1,0 und Degree 0,5. Das Signal-Rauschen Verhältnis wird durch die Noise Removal, Parameter 3 Funktion zumindest optisch verbessert. Eine Rückrechnung des Spektrums auf die monoisotopische Masse erfolgt bei der Messung von ganzen Proteinen grundsätzlich nicht, es wird immer die durchschnittliche Masse betrachtet. Kalibriert werden die Spektren jeweils einzeln und manuell.



**Abbildung 4.12:** Massenspektrum der über die HPLC gereinigten Untereinheit III der ATP-Synthase aus *Spinacia oleracea*. Das Protein ist mit knapp 8 kDa relativ klein, es können aber auch problemlos Proteine von 100 kDa abgebildet werden (Schmelz, 2006).

#### 4.15.2 Massenspektrometrie von Mikroproteinen

Mikroproteine wurden uns relativ häufig von der Arbeitsgruppe Kolmar zur massenspektrometrischen Untersuchung gegeben. Diese synthetischen Proteine bestehen aus etwa 20 bis 40 Aminosäuren und haben eine Masse, die im Bereich zwischen den Peptiden aus PMF Untersuchungen und der Masse der oben beschriebenen Proteine liegt. Sie stammen aus der HPLC und liegen gelöst in einem Wasser-Acetonitril Gemisch vor. Ein  $\mu\text{L}$  der Mikroproteinlösung wird mit einem  $\mu\text{L}$  CHCA-Matrixlösung auf das MALDI-Target aufgetragen. Wenn die Probe sehr wenig oder sehr viel Acetonitril enthält (unter 40% oder über 60%), kann es vorkommen, dass sich Matrixlösung und Probe nicht richtig mischen und kristallisieren. Aus diesem Grund wird auf die getrocknete Matrix/Probenmischung 1  $\mu\text{L}$  50%ACN/0,1%TFA gegeben und erneut getrocknet. Für die Messung werden in der Regel die gleichen Parameter wie zur PMF verwendet, eventuell wird der Messbereich hin zum größeren m/z Bereich verlängert. Eine Kalibrierung des Spektrums kann mit dem Kit zur Massenkalisierung von Peptiden durchgeführt werden (siehe Kapitel 4.15.3). Aufgrund der hohen Reinheit der Proben und der nicht allzu großen Massen von wenigen kDa können hier hochwertige Spektren erwartet werden.

---

#### 4.15.3 Peptide Mass Fingerprinting

Peptide Mass Fingerprinting (PMF) ist eine häufig angewandte Methode zur Identifikation von Proteinen. Sie nutzt die Tatsache, dass, aufgrund der Wahl einer Protease mit hoher Spezifität, ein Protein enzymatisch immer in die gleichen Peptide aufgespalten wird. Die Gesamtheit der Massen dieser Peptide ergibt einen „Fingerabdruck“, d.h. ein unverwechselbares Kennzeichen genau dieses Proteins. Verwendet wird ein Protokoll, das nach Shevchenko modifiziert (Shevchenko et al., 1996) und in der Arbeitsgruppe von Rexroth (Rexroth, 2004) etabliert wurde. Als Protease wird standardmäßig Trypsin, selten Chymotrypsin oder eine Kombination dieser beiden eingesetzt. Trypsin eignet sich besonders gut für PMF, da dieses Enzym ein Protein spezifisch an der C-terminalen Seite eines Lysin- oder Argininrestes schneidet. Durch die relative Häufigkeit dieser Aminosäuren führt der Verdau so zu Fragmenten, die im Durchschnitt zwischen 10 und 20 Aminosäuren lang sind. Die Länge der Fragmente ist entscheidend für eine erfolgreiche Identifizierung. Sind sie zu groß, gibt es nicht genug verschiedene Massen für eine eindeutige Identifikation, sind sie zu klein, kommen die Massen der Peptide in der Datenbank zu häufig vor, oder sie werden von den Signalen der Matrix überlagert.

##### Enzymatische Spaltung der Proteine

Da die Methode des PMF extrem empfindlich auf Verunreinigungen reagiert, zum Beispiel durch das in Hautschuppen vorkommende Keratin, das praktisch überall vorkommt, wird während der gesamten Prozedur genau auf die Sauberkeit geachtet. Alle verwendeten Lösungen werden mit MilliQ Wasser angesetzt, das ist bidestilliertes Wasser, gefiltert mit der Simplicity Wasseraufbereitungsanlage von Millipore. Gebrauchsgegenstände werden in der Flow Bench gelagert, gereinigt werden sie ohne außerhalb der Bench abgelegt zu werden, oder nur auf speziell mit MilliQ Wasser gereinigten Arbeitsplätzen.

Nach der Gelelektrophorese werden die Proteine zur massenspektrometrischen Untersuchung ausgewählt und mit dem Skalpell ausgestochen. Die Banden oder Punkte sollten möglichst gut von anderen abgegrenzt sein, unter Umständen wird nur ein Teil der Bande ausgestochen, um die Kontamination mit einem anderen Protein zu

vermeiden. Die aus dem Gel ausgestochenen Proteinbanden werden mit dem Skalpell zerkleinert um ihre Oberfläche zu vergrößern. Sie sind entweder mit Coomassie R-250 oder mit Silber gefärbt. Diese Farbstoffe werden vor der enzymatischen Spaltung der Proteine entfernt. Im Falle der Silberfärbung gelingt das durch die Zugabe von gleichen Teilen von Kaliumhexacyanoferrat- und Natriumthiosulfatlösung (Gharahdaghi et al., 1999). Die Gelstückchen werden für einige Minuten in den Lösungen inkubiert, solange, bis sie durchsichtig sind. Die Entfärbelösung wird abgesaugt und die Gelstücke werden zweimal für 15 Minuten mit Wasser gewaschen. Die Silberbanden sind jetzt farblos. Das Protokoll gleicht ab hier dem für Coomassie-gefärbte Gelbanden. Sie werden für 20 Minuten in 200  $\mu$ L ABC 50 Lösung inkubiert (siehe Tabelle Kapitel 4.15.3), dann zweimal für 20 Minuten in 200  $\mu$ L ABC25/ACN50. Der letzte Schritt wird solange wiederholt, bis die Coomassie-gefärbten Banden vollständig entfärbt sind.

Natriumthiosulfat-Lösung	Natriumthiosulfat	100 mM
Kaliumhexacyanoferrat-Lösung	Kaliumhexacyanoferrat	30 mM
ABC 50 Lösung	Ammoniumbicarbonat	50 mM
ABC 25 Lösung	Ammoniumbicarbonat	25 mM
ABC 25/ACN 50 Lösung	Ammoniumbicarbonat	25 mM
	Acetonitril	50% (v/v)
Extraktionslösung	Acetonitril	50% (v/v)
	Trifluoressigsäure	0,5% (v/v)
TFA-Lösung	Trifluoressigsäure	0,5% (v/v)
Trypsinlösung	Trypsin (aus Schwein)	0,002% (w/v)
	Ammoniumbicarbonat	25 mM
CHCA Matrix Lösung	A-Cyano-p-Hydroxyzimtsäure	0,5% (w/v)
	Acetonitril	50% (v/v)
	Trifluoressigsäure	0,1% (v/v)
Auftragslösung	Acetonitril	50% (v/v)
	Trifluoressigsäure	0,1% (v/v)

200  $\mu$ L Acetonitril wird zu den Banden gegeben. Sie schrumpfen zusammen und färben sich weiß, da ihnen das Wasser entzogen wird. Das Acetonitril wird abgesaugt und die Proteinase dazugegeben. Die Endkonzentration der Proteinase liegt dabei bei 3,3  $\mu$ g/mL. Die Menge an Flüssigkeit wird dabei so gewählt, dass die Gelstückchen

---

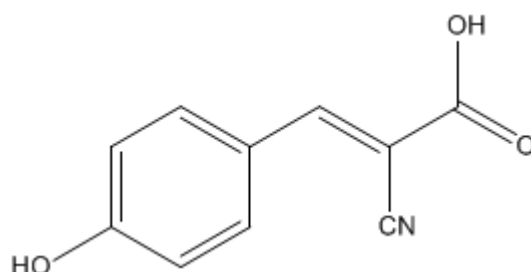
vollständig rehydrieren. Damit der Verdau nicht schon vorher beginnt, werden die Proben zu diesem Zeitpunkt für etwa 15 Minuten in den Kühlschrank gestellt, ehe sie für acht Stunden in einen auf 37°C beheizten Inkubator gestellt werden. Um die Peptide aus dem Gel zu eluieren, werden 70  $\mu\text{L}$  Extraktionslösung zu den Gelstücken gegeben. Nach 20 minütiger Inkubation wird diese Lösung, in der jetzt die Peptide enthalten sind, in eine 96-Loch-Platte abgesaugt und eingetrocknet.

#### Reinigung der Proben an ZipTips®

Die lyophilisierten Proben werden in 15  $\mu\text{L}$  TFA-Lösung aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Um hydrophile Verunreinigungen wie z.B. Salze von den Peptiden zu trennen, werden sie durch das Binden an  $\text{C}_{18}$  ZipTips®, Spülen mit TFA-Lösung und anschließendes Eluieren weiter gereinigt (Kussmann et al., 1997). Für ein genaues Protokoll siehe meine Diplomarbeit (Schwassmann, 2004). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sehr hydrophile Peptide bei der Reinigung verloren gehen, da sie mit der TFA-Lösung von der Säule eluieren. Ebenso verliert man sehr hydrophobe Peptide, da sie sich mit der verwendeten Elutionslösung teilweise nicht mehr von der Säule trennen.

#### Probenauftrag

1  $\mu\text{L}$  der Probenlösung und 0,5  $\mu\text{L}$  der CHCA (siehe Abbildung 4.13) Matrixlösung werden nacheinander auf die MALDI-Probenplatte pipettiert. Dabei wird die Platte selbst nicht mit der Pipette berührt, auf diese Weise bildet sich eine ebene Kristallschicht.



**Abbildung 4.13: Strukturformel von  $\alpha$ -Cyano-p-Hydroxycimtsäure.** Diese Verbindung wird als Matrix für die PMF Untersuchungen eingesetzt.

---

Rechts oberhalb der Probe werden 350 nL eines Kalibrierstandards aus verschiedenen Peptiden in Matrixlösung aufgetragen (siehe Tabelle 4.5). Nachdem die Lösung vollständig getrocknet ist, wird die Messung gestartet.

**Tabelle 4.5: Zusammensetzung der Peptidmischung zur Kalibrierung der Massenspektren** von Peptiden. Da alle Massen im Spektrum auf ihre monoisotopischen Massen rückgerechnet werden, werden auch bei den Standardpeptiden die monoisotopischen Massen verwendet.

Peptid des Massestandards	Monoisotopische Masse
Des-Arg-Bradykinin	904,05
Angiotensin I	1.296,69
Glu-Fibrinopeptid B	1.570,68
Neurotensin	1.672,92
ACTH (1-17 clip)	2.093,09
ACTH (18-39 clip)	2.365,20
ACTH (7-38 clip)	3.657,93

### MALDI-Messung

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wird das Voyager DE-Pro Massenspektrometer von Applied Biosystems benutzt. Die Messungen werden im Reflektormodus durchgeführt, da er aufgrund der längeren Flugstrecke eine höhere Massengenauigkeit bietet als der lineare Modus. Gemessen wird in einem Bereich von 500 bis 5000 m/z mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, einer Grid-Spannung von 72%, einer Guidewire-Spannung von 0,02% und einer um 150 ns verzögerten Extraktionszeit. Die Laserintensität kann von der Steuerautomatik geregelt werden. Sie wird so eingestellt, dass die Messung bei einer Laserstärke von 1800 (relative Einheiten die das Gerät verwendet) begonnen wird und schrittweise auf 2000 oder 2050 erhöht wird, sollte dies nötig sein. Hierbei wird nach jeder Messung die Qualität des Spektrums im Bezug auf die Signalstärken beurteilt und das Spektrum dann abgespeichert, wenn die Laserintensität hoch genug ist. Eine zu niedrige Intensität führt zu einer geringen Signalstärke, bei der einzelne, für die Identifikation wichtige Peptide, nicht erkannt werden können. Eine zu hohe Laserintensität führt zu einer

---

Fragmentierung des Proteins und somit zu starken Störsignalen im unteren Massenbereich. Außerdem verursachen die Peptidfragmente zusätzliche Signalen, die die Identifikation des Proteins erschweren.

#### Analyse der Spektren und Datenbankvergleiche der Peptide

Die Bearbeitung der Spektren erfolgt mit dem Programm „Data Explorer“. Die Spektren werden zuerst auf die Peptide des Standards, danach auf die Massen zweier autoproteolytischer Trypsinpeptide kalibriert. Auf diese Weise wird eine hohe Massengenauigkeit von 30 ppm erreicht, verschiedene Isotope der Peptide sind im Spektrum sichtbar. Für die Datenbanksuche nach dem Protein, das in die gemessenen Massen gespalten werden kann, sind nur die monoisotopischen Massen der Peptide relevant. Aus diesem Grund werden die Spektren nach der Kalibrierung auf eben diese monoisotopischen Massen zurückgerechnet. Massen, die zu einem posttranslational modifizierten oder nicht korrekt gespaltenen Peptid gehören, oder die von Verunreinigungen wie zum Beispiel Keratin stammen, verschlechtern die Möglichkeit einer positiven Identifikation des Proteins. Massen, die durch den Verdau von Keratin oder den Selbstverdau der Protease verursacht werden, filtert das Programm über eine Negativliste aus. Ist das Spektrum soweit bearbeitet, wird eine Liste aller Massen ausgelesen, mit der anschließend eine Datenbanksuche mit den Programmen „Mascot“ oder „Al Dente“ durchgeführt wird. Beide Programme können dabei auf unterschiedliche Datenbanken zugreifen, wie NCBI oder Swiss-Prot. Wegen der größeren Menge an eingetragenen Proteinen habe ich zur Identifikation der Proteine auf die Einträge der NCBI Datenbank zugegriffen. Man erzielt unabhängig vom Programm die gleichen Ergebnisse, allerdings unterscheidet sich die Bewertung der Qualität dieser Ergebnisse, bedingt durch die unterschiedlichen von den Programmen verwendete Rechenmodelle zur Berechnung des sogenannten „Scores“. Er bewertet die Signifikanz der Ergebnisse anhand der Sequenzabdeckung, der Zahl der Massenübereinstimmungen zwischen Spektrum und theoretischem Verdau, der Messgenauigkeit mit der das Spektrum aufgenommen wurde und der Größe der gewählten Datenbank. Mascot bietet die Möglichkeit, verschiedene mögliche oder auf jeden Fall vorhandene translationale Modifikationen anzugeben. Diese werden je nach Art der Behandlung der Probe gewählt, beispielsweise kommt eine Oxidation des

---

Methionins relativ häufig vor und sollte daher als mögliche Modifikation angegeben werden. Die „missed cleavages“ bezeichnen Sequenzen, die eigentlich von der Protease hätten geschnitten werden sollen. Aufgrund der dreidimensionalen Struktur im Bereich mancher potentieller Schnittstellen kommt es jedoch dazu, dass die Spaltung nicht stattfindet, z.B. wenn die Schnittsequenz nah an einem Terminus liegt. Aus diesem Grund wird für die „missed cleavages“ ein Wert von eins angegeben. Die entsprechend für das Programm „AL Dente“ verwendeten Einstellungen können in (Schmelz, 2006) nachgelesen werden.

#### 4.15.4 Isotopenmarkierung

Die Isotopenmarkierung zur massenspektrometrischen Quantifizierung erfolgt bei der Anzucht des zu markierenden Organismusses, hier *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Algen werden photoautotroph (siehe Kapitel 4.4) angezogen, wobei im Anzuchtmedium ein Ammoniumchlorid verwendet wird, das zu mindestens 98%  $^{15}\text{N}$  enthält. Nachdem die Zellen hochgewachsen sind, werden sie mit einer zeitgleich gestarteten Algenanzucht von photomixotrophen Zellen gemischt. Die photomixotrophen Zellen haben während ihres Wachstums die natürliche Isotopenverteilung von Stickstoff (hier liegt der Anteil von  $^{15}\text{N}$  bei 0,3663 %) in ihre Biomoleküle eingebaut, deshalb kann in der MALDI-Analyse ein Massenunterschied zwischen den Peptiden aus den zwei verschiedenen Anzuchten festgestellt werden. Durch den Vergleich der Signalintensitäten von  $^{15}\text{N}$  markierten und nicht markierten Peptiden des gleichen Proteins ist eine Quantifizierung möglich. Eine genauere Beschreibung der Methode ist in der Dissertation von Rexroth (Rexroth, 2004) und in Kapitel 2.1.2 zu finden, die Auswertung eines solchen Experiments ist im Ergebnisteil (Kapitel 5.1) beschrieben.



---

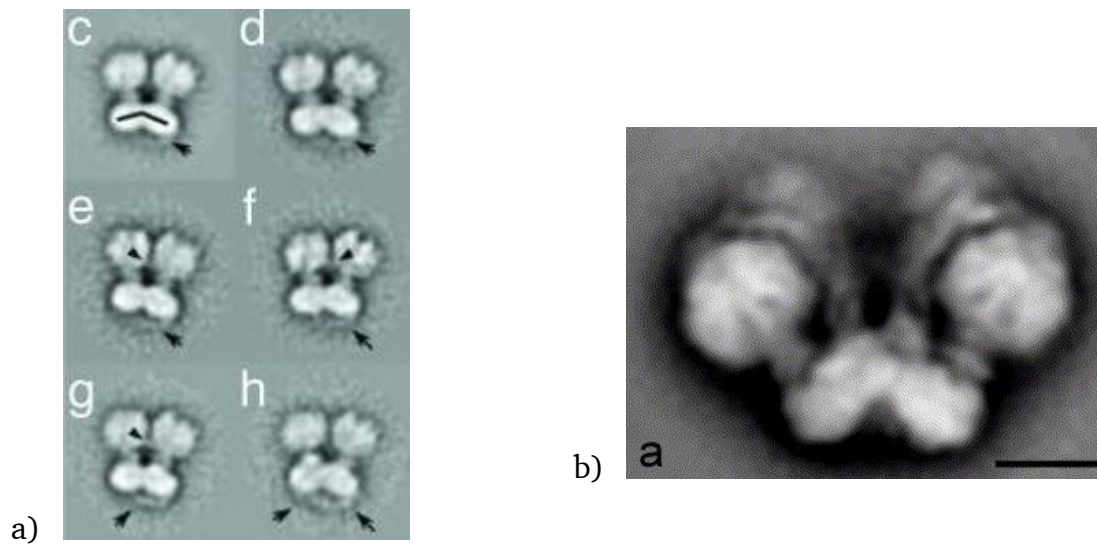
## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Dimerisierung von Chloroplasten-ATP-Synthase in *Chlamydomonas reinhardtii* ist abhängig vom metabolischen Zustand der Zellen

Die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase (siehe Kapitel 2.4) ist in der inneren Membran von Mitochondrien, der Thylakoidmembran von Chloroplasten sowie in der Plasmamembran von Eubakterien lokalisiert, wo sie durch die Generierung von ATP eine universelle „Währung“ der Energie für die unterschiedlichsten zellulären Prozesse zur Verfügung stellt. Es sind verschiedene Formen der ATP-Synthase bekannt; gemeinsam ist ihnen allen jedoch, dass sie membranintegrale Proteinkomplexe sind, also eine Membran vollständig durchspannen. Grünpflanzen, wie der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *Chlamydomonas reinhardtii*, sind für eine Untersuchung der F-Typ ATP-Synthasen unter anderem so interessant, weil sie –in ihren Mitochondrien und Chloroplasten- zwei verschiedene Arten dieses Komplexes besitzen.

$F_0F_1$ -ATP-Synthasen bilden, wie schon für unterschiedliche evolutionär weit voneinander entfernte Organismen nachgewiesen werden konnte, Dimere und teilweise auch größere Oligomere wie z.B. Tetramere. Zuerst beschrieben für *Paramecium multimicronucleatum* (Allen et al., 1989), fanden sich solche Superkomplexe auch in den Mitochondrien von Säugetieren (Schägger and Pfeiffer, 2000; Krause et al., 2005; Reifschneider et al., 2006), verschiedenen Pilzen (Arnold et al., 1998a; Krause et al., 2004b), einzelligen Grünalgen (van Lis et al., 2003) und höheren Pflanzen (Eubel et al., 2004a; Krause et al., 2004a). Erst 1998 jedoch wurde von Arnold et al. ein Vorkommen speziell von Dimeren nach einer schonenden Solubilisierung nachgewiesen und den Dimeren eine physiologische Bedeutung zugeschrieben. Elektronenmikroskopische Bilder der ATP-Synthase-Dimere aus der Einzelpartikelanalyse, die aus den Mitochondrien von Rind bzw. *Polytomella*, einer

Grünalge, stammten (Abbildung 5.1), wurden unabhängig voneinander von Minauro-Sanmiguel et al. und von Dudkina et al. 2005 veröffentlicht.



**Abbildung 5.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mitochondrialen ATP-Synthase-Dimeren (a) Aus Rinderherz (Minauro-Sanmiguel et al., 2005). Gezeigt sind hier die Bilder c bis h der Originalveröffentlichung. In Bild c sind schwarze Linien eingefügt, um den Winkel von  $40^\circ$  zwischen den Längsachsen der ATP-Synthasen besser hervorzuheben. Die Pfeile zeigen zwischen den Subkomplexen  $F_1$  und  $F_0$  an der Dimerisierung beteiligte Proteinuntereinheiten. (b) Aus der Grünalge *Polytomella* (Dudkina et al., 2005). Hier ist ausschließlich der  $F_0$  Teil des Komplexes an der Dimerisierung beteiligt. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 10 nm. Die Längsachsen der ATP-Synthasen bilden einen Winkel von  $70^\circ$ .

Die Bedeutung dieser Dimere für die Funktion der mitochondrialen ATP-Synthase konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, obwohl verschiedene Hypothesen durch experimentelle Daten und durch die gewonnenen EM-Strukturen gestützt werden. So wurden als mögliche Funktionen der Dimere eine dichtere Packung der Proteine in der Membran, die Verbesserung der Effizienz der Energieumwandlung sowie die Modulation der ATP-Synthase-Aktivität in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen genannt, sowie eine höhere Stabilität; die Dimere wurden weniger stark von Proteasen angegriffen (Arnold et al., 1998a). Die mitochondrialen ATP-Synthasen sind darüberhinaus in der Lage, kettenförmige Oligomere zu bilden, die an stark gewölbten Christaestrukturen gefunden wurden (Allen et al., 1989). Darauf aufbauend sind, laut einer Veröffentlichung von Giraud (Giraud et al., 2002), die Dimere der ATP-Synthase für die Krümmung der inneren Mitochondrienmembran und die Morphologie der

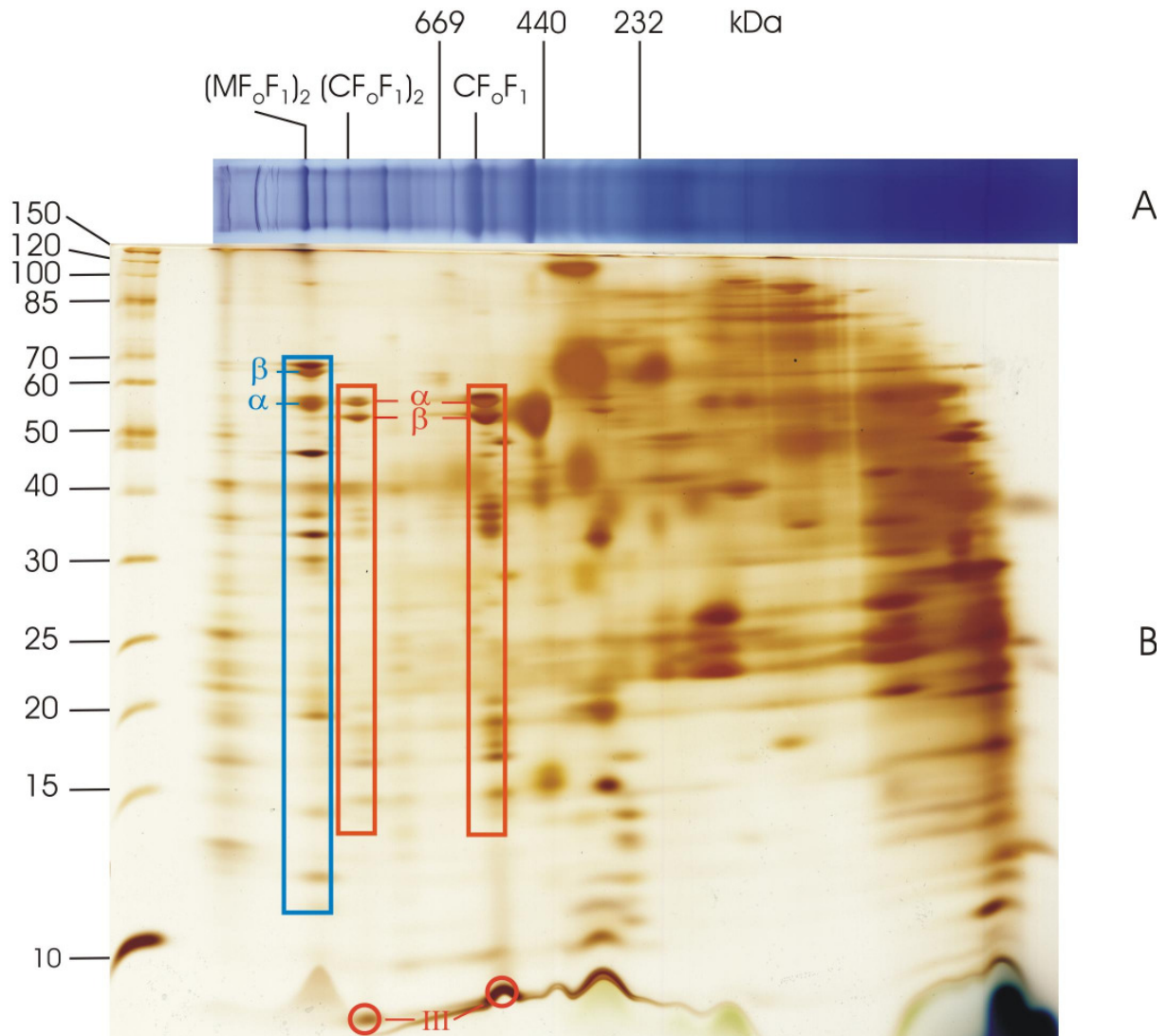
---

Christae verantwortlich. Diese These wird gestützt durch die Entdeckung, dass die Mitochondrien von Hefezellen, die bestimmte dimer-spezifische Untereinheiten und somit ATP-Synthase Dimere nicht bilden, eine veränderte Morphologie aufweisen. Die Christae in diesen Zellen haben nicht die normalen Einstülpungen sondern eine zwiebelschalenartige Anordnung (Paumard et al., 2002). Bisher wurden bei allen mitochondrialen ATP-Synthase Dimeren für das Dimer spezifische Proteinuntereinheiten gefunden.

### 5.1.1 Untersuchungen der Chloroplasten-ATP-Synthase Dimere durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nachdem 2004 das Vorkommen von ATP-Synthase-Dimeren auch in Chloroplasten, nämlich in denen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen wurde (Rexroth et al., 2004), stellte sich auch die Frage nach der Funktion und Bedeutung der  $CF_0F_1$ -Dimere. Die Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimere, oder  $(CF_0F_1)_2$ , unterscheiden sich hier stark von den in den Mitochondrien gefundenen Komplex V-Dimeren. Zum einen sind in *Chlamydomonas reinhardtii* diese aus Chloroplasten stammenden ATP-Synthase-Dimere weitaus weniger stabil als die mitochondrialen ATP-Synthase-Dimere (der Komplex liegt nach einer Solubilisierung mit Digitonin ausschließlich als Dimer vor), zum anderen zeigt sich bei  $(CF_0F_1)_2$  eine Dissoziation in Monomere bei erhöhter Phosphat- oder Vanadatkonzentration.

Eine zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einer blau-nativen ersten und einer denaturierenden zweiten Dimension soll zeigen, ob sich Monomer und Dimer in ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung unterscheiden. Für diese Analyse werden die Algen photomixotroph angezüchtet und aus ihnen die Chloroplasten präpariert (siehe Kapitel 4.4-4.5). Diese Fraktion enthält auch immer einen Anteil an Mitochondrien, so dass die mitochondrialen ATP-Synthasen im Gel ebenfalls sichtbar sind (siehe Abbildung 5.2), jedoch eindeutig unterschieden werden können.

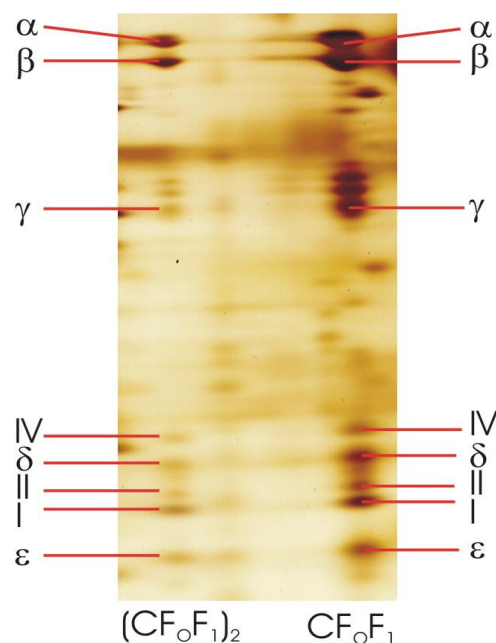


**Abbildung 5.2: Zweidimensionale BN/SDS-PAGE der Chloroplastenfraktion aus photomixotroph angezüchteten *Chlamydomonas reinhardtii*.** Die Chloroplasten wurden mit 1% (w/v) Digitonin solubilisiert, was ungefähr einem Protein zu Digitonin-Verhältnis von 1 zu 4 entspricht. (a) Die ATP-Synthase-Komplexe nach der ersten, blau-nativen Gel-Dimension, nachgefärbt mit Coomassie. Laufrichtung von links nach rechts. Das Gel enthält 3,5 bis 13% Totalacrylamid. (b) Die gleichen Komplexe in der zweiten Gel-Dimension nach Silberfärbung. Die Massen der Standards sind in kDa angegeben, Laufrichtung von oben nach unten. Das Gel enthält 13% Totalacrylamid. Die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und III (aus Chloroplast) sind in der Abbildung markiert.

$(MF_oF_1)_2$  – Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase,  $(CF_oF_1)_2$  – Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase,  $CF_oF_1$  – Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase

In Abbildung 5.2 sind die ATP-Synthasen aus Chloroplasten und Mitochondrien der Alge zu sehen. Der mitochondriale Komplex liegt ausschließlich als stabiles Dimer vor, daher gibt es in der ersten, blau-nativen Dimension nur eine entsprechende Bande mit

einer apparenten Molmasse von knapp über 1,5 MDa und im 2D-SDS-Gel nur eine einzige Reihe von entsprechenden Untereinheiten. Ein Monomer würde das gleiche Bandenmuster bei 750 kDa aufweisen, ist jedoch nicht zu sehen. Der chloroplastidische Komplex dagegen existiert sowohl als Monomer als auch als Dimer. Zwei zugehörige Banden sind im BN Gel bei apparenten Molmassen von knapp 1300 kDa und etwas über 600 kDa sichtbar. Die Abschätzung der apparenten Molmassen erfolgte durch den Vergleich der Laufstrecken der  $(CF_0F_1)_2$ - und  $CF_0F_1$ -Banden mit solubilisierten Rinderherzmitochondrien. Hier erreicht  $CF_0F_1$  eine geringfügig kürzere Laufstrecke im Gel als das bovine Komplex III-Dimer (500 kDa),  $(CF_0F_1)_2$  erscheint kleiner, aber von ähnlicher Masse im Vergleich zum bovinen Komplex V Dimer (Rexroth et al., 2004). In der zweiten Gel-Dimension erkennt man die Untereinheiten des monomeren und dimeren  $CF_0F_1$ . Die Spots der Untereinheiten des Dimers sind generell weniger stark ausgeprägt als die des Monomers. Obwohl sich Silber-gefärbte Gele schlecht zur Quantifizierung von Proteinen eignen (siehe Kapitel 2.2.1), kann durch Betrachten der zwei Gel-Dimensionen schon abgeschätzt werden, dass der kleinere Teil der Chloroplasten-ATP-Synthase in dimerer Form vorliegt. Abbildung 5.3 zeigt diesen Teil des 2D Gels in der Vergrößerung.



**Abbildung 5.3: Vergrößerung eines Ausschnitts der zweiten Gel-Dimension aus Abbildung 5.2.** Zu sehen sind die Untereinheiten von Monomer und Dimer der Chloroplasten ATP-Synthase. Die Identität der Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , I und IV wurde mittels MALDI-MS bestimmt bzw. im Fall der übrigen Untereinheiten anhand ihrer bekannten Molmasse zugeordnet. Die Untereinheit III ist nicht auf der Ausschnittsvergrößerung zu sehen, sie ist in Abbildung 5.2 markiert. Weitere Proteine, die zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit laufen, sind keine Bestandteile der ATP-Synthase.

Man sieht die bekannten Untereinheiten des  $F_0$ -Teils I bis IV, wobei die Untereinheit III nur in Abbildung 5.2, nicht in der Vergrößerung in 5.3 sichtbar ist. Das Monomer

---

dieser Untereinheit besitzt eine molekulare Masse von 8,125 kDa, und bildet im nativen Komplex einen Ring mit wahrscheinlich 13 Untereinheiten (Meyer zu Tittingdorf et al., 2004). Die Untereinheiten IV und I wurden durch PMF-Analyse identifiziert. Untereinheit II kann nicht identifiziert werden, da sie im Gel zu dicht zwischen den anderen Untereinheiten liegt, und daher das Ergebnis der PMF-Analyse nicht eindeutig ist. Da aber die Größe von Untereinheit II bekannt ist (siehe Tabelle 5.1), können die entsprechenden Spots im Gel eindeutig zugeordnet werden. Bedingt durch ihre geringe molekulare Masse und ihre Sequenz, die nicht genug Schnittstellen für Trypsin enthält, ergibt die Untereinheit III bei der PMF-Analyse keine Messwerte, die zu einer Identifikation führen. Sie ist jedoch durch das Bandenmuster im SDS-Gel, aufgrund ihrer massenspektrometrisch bestimmten Gesamtmasse (Meyer zu Tittingdorf et al., 2004) und wegen der charakteristischen dunklen Färbung im Silber-gefärbten Gel eindeutig zu erkennen. Die bekannten Untereinheiten des hydrophilen F<sub>1</sub>-Teils des Komplexes sind ebenfalls zu erkennen. Die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  wurden ebenfalls mittels PMF identifiziert. Oberhalb der Untereinheit  $\gamma$  in Abbildung 5.3 befinden sich noch einige zusätzliche Spots, die jedoch nicht zum Komplex der ATP-Synthase gehören. Sie sind, soweit sie identifiziert wurden, Untereinheiten des Photosystems II. Dieses Photosystem kann, je nach metabolischem Zustand der Zellen, unterschiedliche Stöchiometrien annehmen, so dass die Untereinheiten nach einer 2D-BN/SDS-PAGE Analyse an verschiedenen Stellen auftreten, je nachdem, welche Masse die nativen Komplexe besitzen, die in der ersten Gel-Dimension aufgetrennt werden.

Betrachtet man die Zusammensetzung der Untereinheiten von CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> und seinem Dimer in Abbildung 5.3, so sind hier keine dimerspezifischen Untereinheiten zu erkennen. Der Vergleich der apparenten Molmassen von Monomer und Dimer hingegen lässt keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein oder Fehlen von Dimer-spezifischen Untereinheiten zu, da die Auflösung der Auftrennung in der ersten Gel-Dimension nicht genau genug ist. Für die Dimerisierung mitochondrialer ATP-Synthase sind mehrere Untereinheiten verantwortlich, die z.T. für das Dimer spezifisch sind und im Monomer nicht gefunden werden (Arnold et al., 1998b; Gavin et al., 2005; Wagner et al., 2009). Da die mitochondrialen Dimere sich aber mit ihrer Stabilität gegen eine erhöhte Phosphat- oder Vanadatkonzentration und so

möglicherweise auch in ihrer Funktion von denen in den Chloroplasten unterscheiden, lässt sich hier kein Rückschluss ziehen.

**Tabelle 5.1: Untereinheiten der Chloroplasten-ATP-Synthase.** Die Massen der Untereinheiten aus *Chlamydomonas reinhardtii* werden aus ihren Aminosäuresequenzen berechnet. Hierbei werden, soweit vorhanden, diejenigen Sequenzen benutzt, die keine Präsequenz besitzen und somit das reife Protein darstellen. Die Massen der Untereinheiten des ATP-Synthase-Komplexes aus Spinat wurden aus einer Arbeit von Meyer (Meyer zu Tittingdorf, 2004) übernommen.

<u>Untereinheit</u>	<u>Molekulare Masse in</u> <u><i>Chlamydomonas reinhardtii</i></u>	<u>Molekulare Masse in</u> <u><i>Spinacia oleracea</i></u>	<u>Lokalisierung und</u> <u>Subkomplex</u>
$\alpha$	54,8 kDa	56,8 kDa	Stroma, F <sub>1</sub>
$\beta$	51,9 kDa	53,9 kDa	Stroma, F <sub>1</sub>
$\gamma$	35,0 kDa	38,1 kDa	Stroma, F <sub>1</sub>
IV	26,2 kDa	24,6 kDa	Membranintegral, F <sub>0</sub>
$\delta$	24,0 kDa	21,0 kDa	Stroma, F <sub>1</sub>
II	22,5 kDa	16,5 kDa	Membranintegral, F <sub>0</sub>
I	20,0 kDa	19,0 kDa	Membranintegral, F <sub>0</sub>
$\epsilon$	15,3 kDa	14,9 kDa	Stroma, F <sub>1</sub>
III	8,1 kDa	8,0 kDa	Membranintegral, F <sub>0</sub>

Die Chloroplasten-ATP-Synthase Dimere reagieren auf eine Erhöhung der Phosphatkonzentration, indem sie in ihre Monomere dissoziieren (Rexroth et al., 2004; Schwassmann, 2004). Die Variation der Phosphatkonzentration innerhalb des Stromas der Chloroplasten könnte durch einen regulatorischen Mechanismus genutzt werden, um die ATP-Synthese über Dimerisierung den metabolischen Bedingungen anzupassen. Um Aufschluss darüber zu gewinnen, werden Algen unter unterschiedlichen metabolischen Bedingungen angezüchtet und deren Proteom auf den Gehalt an monomerer und dimerer chloroplastidischer und mitochondrialer ATP-Synthase untersucht.

### 5.1.2 Metabolische *in vivo* Markierung der Algen mit <sup>14</sup>N und <sup>15</sup>N

Für die Untersuchung unterschiedlicher metabolischer Bedingungen eignet sich die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besonders gut, da sie sowohl photoautotroph Energie aus dem Sonnenlicht bezieht als auch heterotroph organische Moleküle

---

metabolisiert. Somit können die Einflüsse verschiedener metabolischer Zustände auf die Anordnung der zwei verschiedenen F-Typ-ATP-Synthasen in den Chloroplasten und den Mitochondrien betrachtet werden. Die zwei in dieser Arbeit untersuchten Zustände sind erstens die reine Photoautotrophie, in der die Algen ihre Energie ausschließlich über Photosynthese beziehen, und zweitens die Photomixotrophie, in der zwar auch Photosynthese stattfindet, aber gleichzeitig organische Moleküle, genauer gesagt Acetat, aus dem Anzuchtmedium metabolisiert werden. Den photoautotrophen Algenkulturen wird ausschließlich  $^{15}\text{N}$  angereichertes Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle hinzugegeben, so dass die Algen während ihres Wachstums und der Zellteilung dieses Stickstoffisotop in alle von ihnen synthetisierten Biomoleküle, wie z.B. in die Aminosäuren, somit auch in die ATP-Synthasen, einbauen. Die unterschiedlichen Massen des Stickstoffs, der sich in den Biomolekülen der Organismen befindet, markieren sie, so dass die zu vergleichenden Proben vor Beginn der Präparation gemischt werden können. Bei der massenspektrometrischen Analyse erzeugen dann die zu quantifizierenden Moleküle unterschiedliche Signale; so können sie der Probe, aus der sie stammen, in diesem Fall einem bestimmten metabolischen Zustand, zugeordnet werden. Methodisch bedingte Ungenauigkeiten in der Proteinbestimmung oder der Solubilisierung, die zum Verlust eines Teils der Probe führen, beeinflussen in diesem Fall nicht das Ergebnis, da sie alle die zwei zu vergleichenden Proben gleichermaßen betreffen.

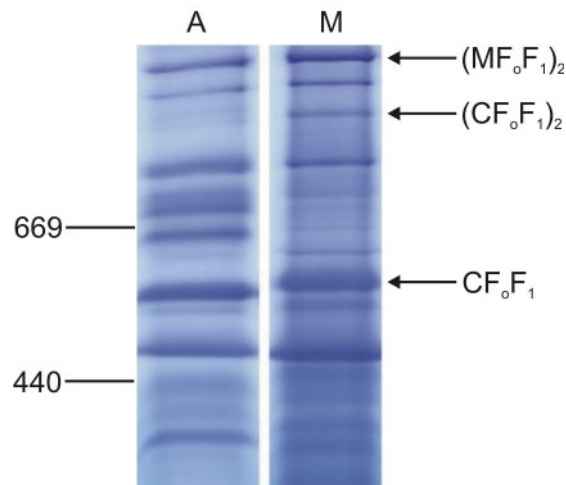
Die Verwendung von  $^{15}\text{N}$  hat keinen Einfluss auf das Wachstum der Organismen; die Wachstumskurven sowie die Bandenmuster der  $^{15}\text{N}$ -Chloroplasten-Solubilisate im BN-Gel sind gleich (eigene Daten). Auch in der Literatur wird die Verwendung von  $^{15}\text{N}$  als Markierung für die Proteine unterschiedlicher Organismen wie *S. cerevisiae* (Oda et al., 1999), *Deinococcus radiodurans* (Conrads et al., 2001), *C. elegans*, *D. melanogaster* (Krijgsveld et al., 2003) und verschiedene Säuger (Wu et al., 2004) beschrieben, und sogar der Gebrauch an Menschen wird für unbedenklich erklärt (Koletzko et al., 1997).

Die Chloroplasten der photoautotroph gewachsenen mit  $^{15}\text{N}$  markierten Zellen und die der photomixotroph gewachsenen  $^{14}\text{N}$  Zellen werden zunächst getrennt präpariert und untersucht. Hierzu werden die Membranproteine der Chloroplasten mit Digitonin solubilisiert und auf ein blau-natives Gel aufgetragen. Die aufgetrennten



---

Proteinkomplexe in diesem Gel werden nach der Elektrophorese mit Coomassie R-250 nachgefärbt und digitalisiert (siehe Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4: Blau-natives Gel von mit Digitonin solubilisierten *C. reinhardtii*-Chloroplasten.**

Die Chloroplasten in Spur A stammen aus einer photoautotroph angezüchteten Algenkultur, die mit  $^{15}\text{N}$  angereichert wurde. Spur M enthält das Solubilisat der photomixotroph auf  $^{14}\text{N}$  gewachsenen Organellen. Die apparenten Molekularmassen sind in kDa angegeben. Die Pfeile zeigen die Positionen der ATP-Synthase Komplexe.

$(\text{MF}_o\text{F}_1)_2$  – Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase,  $(\text{CF}_o\text{F}_1)_2$  – Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase,  $\text{CF}_o\text{F}_1$  – Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase

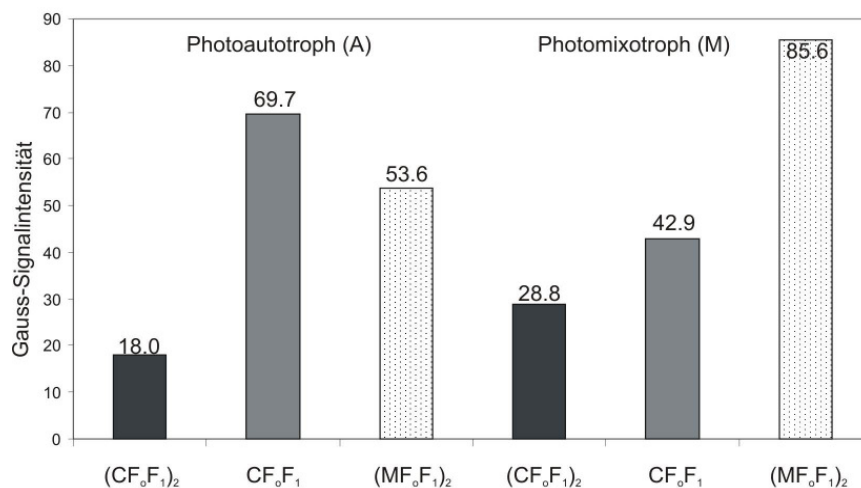
Die Banden von  $(\text{MF}_o\text{F}_1)_2$ ,  $(\text{CF}_o\text{F}_1)_2$  und  $\text{CF}_o\text{F}_1$  werden mit dem BioRad Scanner digitalisiert und mittels QuantityOne quantifiziert. Auf einer Geraden durch die Mitte der Gelspuren wird jedem Punkt auf dem Gel jeweils ein Graustufenwert zugeordnet, der der Bandenintensität entspricht. Integriert man den Bereich unter diesem Graphen, erhält man die relative Proteinmenge, die das Gel an dieser Stelle enthält. Der Graustufenwert wird einerseits durch die Proteinmenge in der Bande, andererseits durch die Hintergrundfärbung bestimmt. Aus diesem Grund wird zuerst der Hintergrund abgezogen (rolling circle Methode, siehe Schäfer 2007), ehe die Fläche unter dem Graphen integriert wird. Des Weiteren verteilen sich die Proteine in einer Bande so, dass in dieser Art der Auftragung eine Gauß-Kurven Form entsteht. Hat der Querschnitt der Bande eine andere Form, sind es mehrere Proteinbanden, die ineinander übergehen, oder eine Verunreinigung bzw. Präzipitat verzerrt das Bild. Aus diesem Grund wird die Form der Banden vor der Auswertung von QuantityOne mit einer Gauss-Kurven-Funktion unterlegt. Gemessen werden die Graustufenwerte von

jeweils beiden  $(MF_oF_1)_2$ -,  $(CF_oF_1)_2$ - und  $CF_oF_1$ -Banden. Die Zahlenwerte dieser Messungen sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst und in Abbildung 5.5 dargestellt.

**Tabelle 5.2: Färbung der Banden von ATP-Synthase-Komplexen im blau-nativen Gel;** Zahlenwerte entsprechen den von QuantityOne verwendeten Graustufenwerten.

	Photoautotrophe Algen ( $^{15}N$ )	Photomixotrophe Algen ( $^{14}N$ )
Mitochondriale ATP-Synthase, Dimer	53,6	85,6
Chloroplasten ATP-Synthase, Dimer	18,0	28,8
Chloroplasten ATP-Synthase, Monomer	69,7	42,9

Die photomixotrophen Algen enthalten 60% mehr mitochondriale ATP-Synthase als die photoautotrophen. Dieser Umstand kann dadurch erklärt werden, dass die Algen hier organische Moleküle metabolisieren und somit die mitochondriale Atmungskette aktiver ist. Die Gesamtmenge an Chloroplasten-ATP-Synthase ist dagegen in der photoautotrophen Kultur um 22% höher als in der photomixotrophen, da die Photosynthese hier die einzige Möglichkeit zur Energiegewinnung darstellt. Allerdings fällt auf, dass die Verteilung der Chloroplasten-ATP-Synthase auf die monomere und die dimere Form in den zwei Anzuchtbedingungen unterschiedlich ist.



**Abbildung 5.5: Intensitäten der Banden der ATP-Synthase-Komplexe aus *Chlamydomonas reinhardtii* im blau-nativen Gel.** In der Probe aus photomixotropher Anzucht erkennt man eine Verschiebung der Organisation der Chloroplasten-ATP-Synthase ( $CF_oF_1$ ) hin zur dimeren Form im Vergleich zur autotrophen Anzucht. Gleichzeitig steigt der Anteil an gebildeter mitochondrialer ATP-Synthase ( $MF_oF_1$ ), die nur als Dimer vorliegt. In keinem der beiden betrachteten Zustände sind Monomere von  $MF_oF_1$  zu sehen.

Um den Anteil an  $\text{CF}_0\text{F}_1$  zu bestimmen, der als Dimer vorliegt, muss beachtet werden, dass ein Dimer des Komplexes nicht exakt doppelt so viel Coomassie binden kann wie ein Monomer, da die Interaktionsflächen, an denen sich die zwei Komplexe zum Dimer verbinden, für den Farbstoff nicht zugänglich sind. Die Größe dieser Interaktionsflächen ist bisher nicht bekannt, da noch keine Strukturen des chloroplastidischen Superkomplexes veröffentlicht wurden. Um abschätzen zu können, welcher Anteil des Komplexes als Dimer vorliegt, werden die zwei möglichen Extremwerte betrachtet. Erstens die Werte, die man erhält, wäre die Interaktionsfläche gleich null; zweitens die Werte, die man erhält, wenn man eine Interaktionsfläche von einem Viertel der Gesamtfläche annimmt. Eine noch größere Interaktionsfläche anzunehmen erscheint aufgrund der bekannten Form und Struktur des ATP-Synthase-Komplexes nicht sinnvoll. Die sich so ergebenden Werte sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

**Tabelle 5.3: Aus der quantitativen Auswertung (Abbildung 5.5) des blau-nativen Gels aus Abbildung 5.4 berechnete Anteile von Komplex  $\text{CF}_0\text{F}_1$ , die als Monomere und Dimere vorliegen.** Angegeben sind jeweils die Werte für eine für Coomassiebindung verschlossene Kontaktfläche von 0% und 25% (siehe Text).

	Photoautotrophe Anzucht	Photomixotrophe Anzucht
$\text{CF}_0\text{F}_1$ Dimer	21% / 26%	40% / 47%
$\text{CF}_0\text{F}_1$ Monomer	79% / 74%	60% / 53%

In den Chloroplasten der Algen der photomixotrophen Anzucht liegt nach diesen Werten aus der Coomassie-Färbung ein zwischen 1,8 und 1,9-mal so großer Anteil der ATP-Synthasen als Dimer vor wie in Chloroplasten der photoautotrophen Anzucht.

Eine getrennte Bearbeitung von unterschiedlichen Proben, deren Proteom quantitativ verglichen werden soll, beinhaltet immer das Risiko von Fehlern, die durch eine nicht identische Behandlung der Proben entstehen. Viele Schritte in der Präparation und der Analyse der Proben, vom Aufschluss der Algen über die Zentrifugationsschritte, die Chlorophyllbestimmung, bis zur Solubilisierung und der Elektrophorese, können nur schwer als wirklich identisch wiederholbar bezeichnet werden. So ist es möglich, dass artifizielle Unterschiede in den beiden Proben entstehen, oder andersherum

---

entscheidende Unterschiede übersehen werden. Aus diesem Grund, und wegen der oben beschriebenen Unsicherheit im Bezug auf die Bindungsflächen für Coomassie, ist die gemeinsame Bearbeitung der Proben ab einem möglichst frühen Zeitpunkt in der Bearbeitung von Vorteil.

### 5.1.3 Experimente zur massenspektrometrischen Analyse von ganzen Proteinen

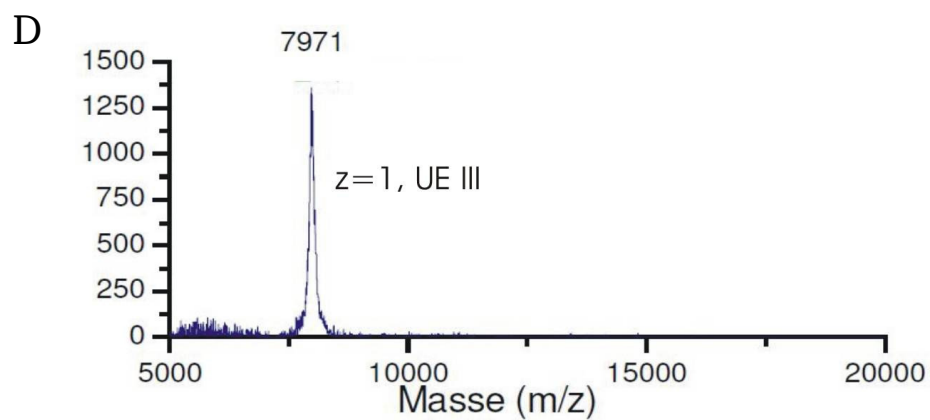
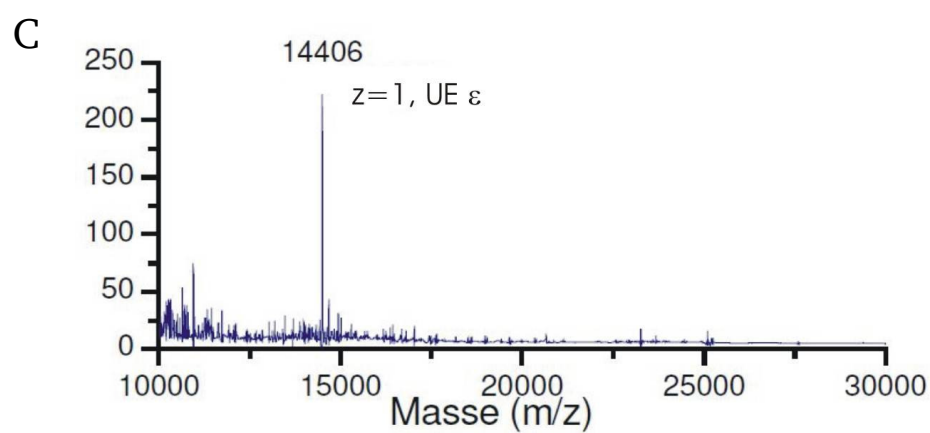
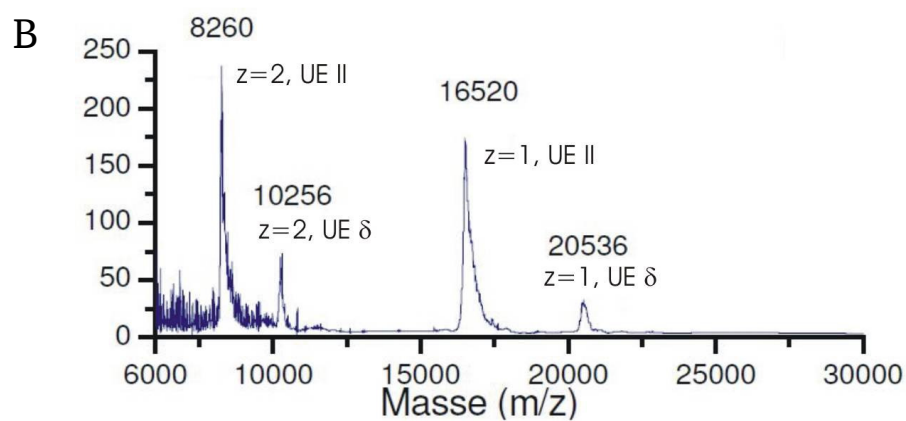
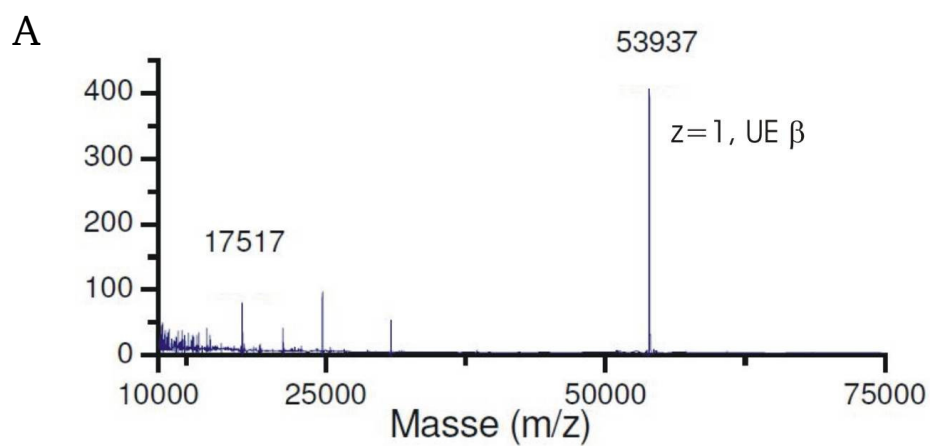
Um eine gemeinsame Bearbeitung beider Proben zu ermöglichen werden die Algen, die wie im vorherigen Experiment in einer  $^{15}\text{N}$  angereicherten phototautotrophen und in einer photomixotrophen Kultur mit natürlicher Isotopenverteilung gewachsen sind, unmittelbar vor der Präparation miteinander gemischt. Die Gewinnung der Chloroplasten, die Solubilisierung der Membranproteinkomplexe und die Analyse im Polyacrylamidgel erfolgen dann für beide Anzuchtbedingungen gemeinsam (Kapitel 5.1.4 und (Rexroth, 2004)).

Grundsätzlich stehen zwei unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung, die isotopenmarkierten Proteine massenspektrometrisch zu untersuchen. Erstens über den Ansatz des Peptide Mass Fingerprinting (PMF), bei der die Proteine vor der Massenspektrometrie tryptisch gespalten werden, und zweitens die direkte Analyse, bei der vollständige Proteine gemessen werden. Der PMF-Ansatz ist nachweislich realisierbar (Rexroth, 2004), bringt aber einen hohen Rechenaufwand mit sich, und die Daten, aus denen die Ergebnisse interpretiert werden, sind aufgrund ihrer Komplexität unübersichtlich. Der Ansatz, in dem ganze Proteine vermessen werden, kann einfach zu deutende, greifbare Ergebnisse liefern, ist aber bisher nicht auf seine Durchführbarkeit hin geprüft worden. Die Ergebnisse beider Ansätze werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Um ganze Proteinuntereinheiten der ATP-Synthase massenspektrometrisch zu untersuchen, ist es zunächst notwendig, diese Untereinheiten voneinander zu trennen. Das gelingt am besten chromatographisch über eine RP-HPLC-Säule, da die über HPLC gereinigten Proteine frei von Detergenzien und anderen störenden Molekülen sind und so Massenspektren von besonders guter Auflösung liefern. Für das Experiment wird aufgereinigte  $\text{CF}_0\text{F}_1$ -ATP-Synthase aus *Spinacia oleracea* verwendet

---

(Seelert et al., 2000), zur Verfügung gestellt von Dr. Holger Seelert. Die aufgereinigte ATP-Synthase wird auf eine RP-HPLC Säule mit C5 Material gegeben und so weiter gereinigt und in ihre Untereinheiten aufgetrennt (Details siehe Schmelz, 2006). Bis auf die hydrophoben Untereinheiten II und IV können durch eine Analyse der Fraktionen auf einem SDS-Gel allen Untereinheiten Signale im Elutionsspektrum zugeordnet werden (Schmelz, 2006). Die massenspektrometrische Analyse erfolgt direkt nach der HPLC. 1  $\mu$ L des Eluats wird ohne weitere Behandlung direkt auf das MALDI-Target aufgetragen und mit 1  $\mu$ L Matrixlösung co-kristallisiert. Als Matrix werden verschiedene Substanzen getestet (siehe Kapitel 4.15.1) und schließlich HABA verwendet, da sich mit dieser Matrix die besten Spektren aufnehmen lassen. Für die Massenspektrometrie werden vier Fraktionen mit Proteinuntereinheiten unterschiedlicher Größe und Hydrophobizität ausgewählt. Die Massen aller gewählten Fraktionen sind in den Spektren zu sehen, nämlich  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  des  $F_1$ -Teils und I und III aus dem  $F_0$ -Subkomplex (siehe Abbildung 5.6).



---

**Abbildung 5.6: Massenspektren von Protein-Untereinheiten der Spinat-ATP-Synthase.** Der aufgereinigte Proteinkomplex ist über eine C5 Säule einer RP-HPLC in seine Untereinheiten aufgetrennt worden und wird mit HABA als Matrix vermessen. Die z-Zahl bezeichnet die Anzahl der Ladungen des gemessenen Ions. A) Spektrum der  $\beta$ -Untereinheit B) Untereinheiten  $\delta$  und II C) Untereinheit  $\epsilon$  D) Untereinheit III

Die Spektren der Proteine aus der HPLC-Auftrennung zeigen erwartungsgemäß eine gute Auflösung mit niedrigem Hintergrundrauschen. Man erkennt die Signale der einzelnen Proteinuntereinheiten, teilweise auch bei deren halber Masse, wenn bei der Ionisierung zweifach geladene Ionen entstanden sind. Zwei unterschiedliche Proteine können problemlos in einem Spektrum gemessen werden, wie man im Spektrum B sieht. Die Signalintensität ist generell im Vergleich zu Messungen von Peptiden geringer. Die größte absolute Signalintensität wurde bei der kleinsten Untereinheit erreicht, der Untereinheit III. Die festgestellten Massen entsprechen entweder den bekannten Werten, oder sie sind etwas geringer (siehe Tabelle 5.1). Die Untereinheit  $\delta$  mit 20,5 kDa liegt in der Messung um 0,5 kDa unter dem Literaturwert von 21,0 kDa, ebenso wie die Untereinheit  $\epsilon$  mit 14,4 kDa (Literaturwert 14,9 kDa). Die gemessenen Werte für die übrigen Untereinheiten  $\beta$ , II und III stimmen mit den Werten aus Tabelle 5.1 überein. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass für die Berechnung der Massen für die Tabelle die teilweise zu langen Aminosäure-Sequenzen zu Grunde gelegt wurden, die das reife Protein aber nicht vollständig enthält.

Um diese Methode mit der Isotopenmarkierung zu kombinieren, müssen folgende Überlegungen angestellt werden: Erstens, wie groß wäre der Massenunterschied zwischen  $^{14}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$  Protein, und würde die Auflösung der Massenspektren ausreichen, um zwei unterschiedliche Signale zu erzeugen? Zweitens, wie können Dimer und Monomer getrennt so isoliert werden, dass die Komplexe für die MALDI-Massenspektrometrie rein genug sind? Die erste Frage lässt sich beantworten, indem der für die ATP-Synthase-Untereinheiten anzunehmende Stickstoffgehalt berechnet wird. Daraus kann der Massenunterschied abgeleitet werden. Zur Berechnung der Zahl aller Stickstoffatome in einem Protein wird die Formel  $\text{C}_{4,93}\text{H}_{7,78}\text{O}_{1,45}\text{S}_{0,04}\text{N}_{1,39}$  (Creighton, 1993) verwendet, die die Summenformel einer durchschnittlichen Aminosäure eines Proteins darstellt. Mit Hilfe dieser Formel wird die Zahl der

---

Stickstoffatome in den Proteinuntereinheiten der ATP-Synthase abgeschätzt, und die Zunahme der Masse durch den Austausch von  $^{14}\text{N}$  durch  $^{15}\text{N}$  berechnet. Im Falle der  $\beta$ -Untereinheit, die aus ca. 490 Aminosäuren zusammengesetzt ist, ergibt sich durch die Formel eine Zahl von gerundet 691 Stickstoffatomen. Die natürliche Isotopenverteilung beim Stickstoff ist so, dass nur ein zu vernachlässigender Anteil von 0,366% bereits  $^{15}\text{N}$  ist, daher kann angenommen werden, dass die Masse des Proteins um 688 Da zunimmt. Eine um 688 Da größere Masse wäre in dem Spektrum aus Abbildung 5.6 zwar als einzelnes Signal erkennbar, aber es gäbe eine deutliche Überschneidung im Bereich der Basis des Peaks. Deutlicher wird das Problem im Fall von Untereinheit III, die aus 81 Aminosäuren aufgebaut ist. Ein Ersetzen von  $^{14}\text{N}$  durch  $^{15}\text{N}$  würde die Masse um etwa 113 Da vergrößern. Das Signal dieser Masse würde im Bereich des  $^{14}\text{N}$  Signals liegen, es käme also zu einem einzigen Peak mit zwei Spitzen.

Um die Proteinuntereinheiten von ATP-Synthase-Monomer und -Dimer als ganze Proteinuntereinheiten quantitativ zu vergleichen, müssen sie zuerst voneinander getrennt werden. Die blau-native Gelelektrophorese bietet diese Möglichkeit. Zur Gewinnung der Proteine aus dem Gel stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung: die Elektroelution (siehe Kapitel 4.12), die passive Elution durch Diffusion aus dem (zerkleinerten) Gel, und das Blotten des Gels auf eine Membran. Die massenspektrometrische Analyse der so getrennten Proteinuntereinheiten ergaben Spektren mit einem erwartungsgemäß schlechteren Signal/Rauschen-Verhältnis als die über eine Säule gereinigten (Schmelz, 2006). Eine hohe Genauigkeit wäre also mit diesen Methoden nicht zu erreichen. Aus diesem Grund wird für die weiteren Untersuchungen die Methode des PMF mit anschließender Quantifizierung gewählt, da sie eine höhere Auflösung der Signale im Massenspektrometer bietet.

#### 5.1.4 Massenspektrometrische Analyse und Quantifizierung der isotoopenmarkierten Peptide

Zur quantitativen Untersuchung von Chloroplasten-ATP-Synthase-Monomer und -Dimer unter verschiedenen Anzuchtbedingungen werden die photoautotroph angezüchteten und mit dem Stickstoffisotop  $^{15}\text{N}$  markierten Algen (siehe Kapitel

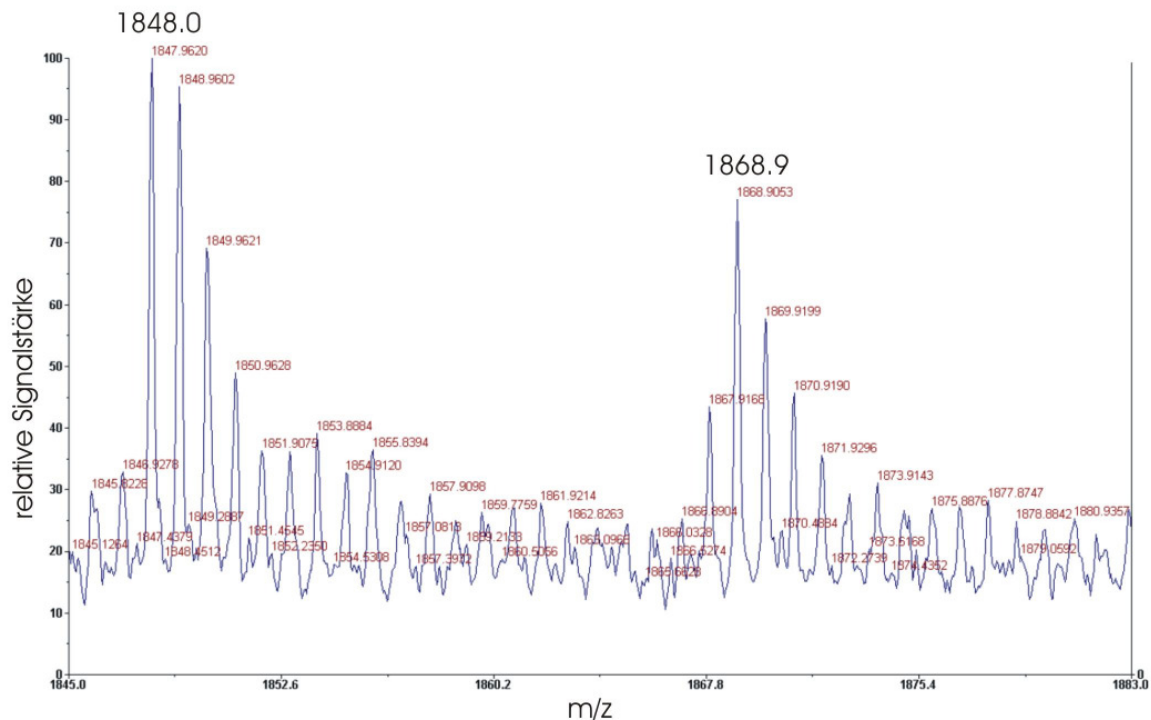


---

5.1.2) unmittelbar vor der ersten Zentrifugation, bei der die Zellen pelletiert werden, mit den Algenzellen aus der photomixotrophen Kultur gemischt. Die weitere Präparation der Chloroplasten erfolgt dann für die Algen aus beiden Anzuchtbedingungen gemeinsam (siehe Kapitel 4.5). Die angereicherten Chloroplasten werden mit Digitonin solubilisiert und auf ein BN-Gel aufgetragen. Sofort nach der Elektrophorese wird eine Spur des blau-nativen Gels ausgeschnitten und für eine zweite Gel-Dimension verwendet. Dieses SDS Gel wird wiederum nach der Elektrophorese mit Silber gefärbt, um die Proteinuntereinheiten der aufgetrennten Komplexe und Superkomplexe sichtbar zu machen. Das Monomer und das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase werden anhand ihrer Massen im blau-nativen Gel und anhand ihres bekannten und identischen Bandenmusters im 2D-BN/SDS-Gel identifiziert (siehe Abbildung 5.2). So sind die ATP-Synthase-Komplexe aus den Chloroplasten eindeutig von der mitochondrialen ATP-Synthase und den anderen Proteinkomplexen und Superkomplexen zu unterscheiden. Jeder Spot in diesem 2D-Gel enthält eine Mischung von dem jeweiligen Protein aus sowohl der photoautotrophen als auch der photomixotrophen Kultur. Der Anteil der Proteine der jeweiligen Anzuchtbedingung wird durch das  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  Verhältnis in diesem Spot wiedergegeben, das durch die nachfolgende MALDI-Untersuchung bestimmt wird.

Die massenspektrometrische Untersuchung wird zunächst genauso durchgeführt wie bei nicht isotoopenmarkierten Proben (siehe Kapitel 4.15.3). Die Identifikation der zum Protein gehörenden Signale geschieht über die  $^{14}\text{N}$  Peptide, die durch den Verdau entstanden sind. Die  $^{15}\text{N}$  Peptide, die ebenfalls enthalten sind, werden in diesem Fall wegen ihrer zu hohen Masse von MASCOT als nicht zuzuordnend klassifiziert und verschlechtern den Score der Ergebnisse, der demnach bei diesem Experiment etwas niedriger ist als bei einer Identifikation über PMF ohne Isotoopenmarkierung.

In den Spektren lassen sich die Signale von Peptiden aus  $^{14}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$  Anzucht außer an ihrer Masse auch anhand ihrer typischen Isotoopenverteilung unterscheiden (siehe Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7: Isotopenmuster im Massenspektrum von Peptiden aus  $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Anzucht.** Links sieht man die typische Isotopenverteilung eines mittelgroßen Peptids mit einer monoisotopischen Masse von 1848 Da, rechts das gleiche Peptid mit  $^{15}\text{N}$ -Markierung. Während beim  $^{14}\text{N}$ -Peptid das Signal der geringsten Masse am höchsten ist, bilden die Peaks beim  $^{15}\text{N}$ -Peptid ein bogenförmiges Muster.

Im unbearbeiteten Massenspektrum besteht das Signal eines Peptids immer aus einer Reihe von Einzelsignalen, von denen jedes eine bestimmte Isotopenverteilung darstellt. Diese Einzelsignale bilden ein Zackenprofil über dem Grundrauschen. Grund hierfür ist die hohe Auflösung des Massenspektrometers in diesem Bereich. Die natürliche Isotopenverteilung beim Kohlenstoff ist 98,9%  $^{12}\text{C}$  und 1,1%  $^{13}\text{C}$ . So verursachen z.B. zwei Peptide, von denen eines ausschließlich  $^{12}\text{C}$  Atome enthält, das andere aber ein einziges  $^{13}\text{C}$  Atom, zwei voneinander abgegrenzte Signale und können so voneinander unterschieden werden. Ebenso verhält es sich mit den Stickstoffatomen, die in verschiedenen Isotopen vorliegen. In der Natur liegt ein Anteil von 99,6% der Stickstoffatome als  $^{14}\text{N}$  vor, so wie in der photomixotrophen Kultur in diesem Experiment. In den  $^{15}\text{N}$ -markierten Algen sind es zu 98%  $^{15}\text{N}$ -Atome. Daraus ergeben sich unterschiedliche Profile der Signalmuster für  $^{14}\text{N}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Peptide. Im unteren bis mittleren Massenbereich bis etwa 2 kDa ist bei den  $^{14}\text{N}$ -Peptiden der erste Peak, der die monoisotopische Masse repräsentiert, der höchste, da

---

hier noch die Wahrscheinlichkeit überwiegt, dass sich ausschließlich  $^{12}\text{C}$ - und  $^{14}\text{N}$ -Isotope in dem Peptid befinden. Bei den Peaks der Peptide, die aus der  $^{15}\text{N}$ -Markierung stammen, sieht das Profil anders aus. Der höchste Peak ist hier an einer Position, die der monoisotopischen Masse + 21 Da entspricht. Das bedeutet, 21  $^{13}\text{C}$ - (aus den 1,1% des natürlich vorkommenden Isotops  $^{13}\text{C}$ ) oder  $^{15}\text{N}$ -Atome (aus den 98%  $^{15}\text{N}$  Anteil der metabolischen Markierung) wurden in das Peptid eingebaut. Die höheren Massensignale, also die monoisotopische Masse +22 Da, 23 Da, 24 Da usw., bilden ein ähnliches Muster wie bei dem unmarkierten Peptid, jedoch gibt es hier auch Signale links des höchsten Peaks. Diese sind auf eine nicht unvollständige Markierung zurückzuführen, da das für die Markierung verwendete Ammoniumchlorid nur 98%  $^{15}\text{N}$  enthält. Das Peptid ist so groß, dass es mit einer signifikanten Wahrscheinlichkeit mindestens ein  $^{14}\text{N}$ -Atom enthält, und der entsprechende Peak so links des höchsten Peaks des  $^{15}\text{N}$ -Peptids sichtbar ist.

Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Signale im Massenspektrum und der Massendifferenz können diese beiden Signale (Abbildung 5.7) als zusammengehöriges Paar für die Quantifizierung identifiziert werden.

Die Spektren werden so bearbeitet, dass für jedes Peptid die Einzelsignale akkumuliert werden. Im Falle der  $^{14}\text{N}$ -Peptide ergibt sich so die monoisotopische Masse, im Falle der  $^{15}\text{N}$ -Peptide die entsprechend höhere. Mit Hilfe eines „Visual Basic“-Programms (Rexroth, 2004) werden die gemessenen Spektren nach solchen Signalpaaren durchsucht. Das Programm richtet sich hierbei nach der Massendifferenz, die ein  $^{15}\text{N}$ -markiertes Peptid nach der durchschnittlichen Summenformel für Aminosäuren (siehe Seite 79) aufweist, wobei Abweichungen in der Anzahl der  $^{15}\text{N}$ -Atome von bis zu 50% zugelassen werden. Das Programm gibt zu Identität und Quantifizierung der Proteine aus den Spektren in einer umfangreichen Excel-Datei die Informationen aus. Für die Quantifizierung wird für jedes Peptidpaar eines Proteins, also für das  $^{14}\text{N}$ -Peptid und sein  $^{15}\text{N}$ -Isotopomer, das  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnis gebildet und eine Standardabweichung berechnet. Die Hälfte der Werte, die die geringere Abweichung zeigen, werden für die Quantifizierung des Proteins genutzt, die andere Hälfte, die in der Werteverteilung unter 25% oder über 75% aller berechneten Verhältnisse liegen, werden verworfen. Das geschieht zu dem Zweck, eventuell falsch zugeordnete Peptidpaare auszufiltern, die sonst das Ergebnis verfälschen würden.

Da vor dem Vereinigen der zwei Anzuchten Biotrockenmasse, Zellzahl und Proteingehalt jeweils unterschiedlich sind, müssen die berechneten Werte normiert werden (siehe Kapitel 2.1.4). Zu diesem Zweck werden 53 zufällig ausgewählte Spots aus dem Gel gestochen und das  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnis all dieser Proteine gemittelt. Dieser Normierungsfaktor wird als das Verhältnis der Gesamtproteinmenge von  $^{14}\text{N}$  zu  $^{15}\text{N}$  betrachtet unter der Annahme, dass sich der Proteingehalt der Chloroplasten nicht signifikant ändert.

Für alle identifizierten Untereinheiten der ATP-Synthase-Komplexe werden dann die  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnisse berechnet und anschließend mit dem Normierungsfaktor verrechnet (siehe Tabelle 5.4).

**Tabelle 5.4: Mittels MALDI-MS gemessene  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnisse der ATP-Synthase-Untereinheiten**, n gibt die Anzahl der  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Peptid-Isotopomerenpaare an, die zur Berechnung des Mengenverhältnisses herangezogen wurden. Der MASCOT-Score der Epsilon-Untereinheit liegt unterhalb der Signifikanzgrenze; aus diesem Grund fließt der entsprechende Wert nicht in die Berechnung des Durchschnittswerts ein. Normiert werden die Verhältnisse indem die aus den Rohdaten berechneten Verhältnissen durch einen Faktor, der dem Durchschnittlichen  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  Verhältnis entspricht, geteilt werden.

Protein	MASCOT-Score	n	$^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnis	$^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnis, normiert
<b>CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Dimer</b>		9	7,0	<b>1,8</b>
Alpha-UE	159	5	6,6	1,7
Beta-UE	126	4	7,4	1,9
<b>CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Monomer</b>		59	2,8	<b>0,72</b>
Alpha-UE	257	19	3,1	0,79
Beta-UE	172	20	2,6	0,68
Gamma-UE	75	10	2,8	0,73
Epsilon-UE	39	4	2,7	0,70
I-UE	103	6	2,8	0,71

Die so erhaltenen Werte für die einzelnen Untereinheiten werden im nächsten Schritt zu Durchschnittswerten für das Monomer und das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase verrechnet. Es ergibt sich hier ein Wert von 0,72 für das Monomer und 1,8 für das Dimer. Diese Zahlen entsprechen relativ genau denen aus der densitometrischen Bestimmung der Mengenverhältnisse (siehe Abbildung 5.5 und

---

Tabelle 5.2). Dort sind die Werte (im Bezug auf eine unbeeinträchtigte Coomassiebindung an das Dimer) 0,6 für das Monomer und 1,6 für das Dimer, berechnet man die jeweiligen Quotienten photoautotroph/photomixotroph ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ).

Das  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnis eines Proteinspots aus dem Monomer der ATP-Synthase erlaubt, verglichen mit dem  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Verhältnis des gleichen Proteins aus dem Dimer des Komplexes, einen direkten quantitativen Vergleich des Anteils von Monomer zu Dimer in photoautotroph und photomixotroph gewachsenen Zellen. In diesem Fall beträgt ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  Monomer, hier 1,8)/ ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  Dimer, hier 0,72) **2,5**.

Wäre das Verhältnis von  $^{14}\text{N}$  zu  $^{15}\text{N}$  in Monomer und Dimer das gleiche (also nicht 2,5 sondern 1, als Ergebnis der Rechnung oben), würde das bedeuten, dass die supramolekulare Struktur der Chloroplasten-ATP-Synthase von den Wachstumsbedingungen der Algen unabhängig ist. Die hier vorliegenden Daten zeigen aber das Gegenteil, nämlich dass in der photoautotrophen Kultur ein 2,5-fach höherer Dimer-Anteil an der gesamten Chloroplasten-ATP-Synthase vorliegt als in der photomixotrophen Kultur, unabhängig davon, ob man die Daten vor der Berechnung normiert oder nicht, da sich der Normierungsfaktor in der Berechnung herauskürzt. Die densitometrische Methode der Quantifizierung ergibt einen sehr ähnlichen Wert von **2,6** (berechnet aus den in Bezug auf die verminderte Coomassiebindung beim Dimer nicht korrigierten Werten), was die hier beschriebenen Ergebnisse wiederum bestätigt.

Zur weiteren Bestätigung wird die experimentelle Reihe neu angesetzt. Hierzu werden neue Algenzellen bei der Sammlung für Algenkulturen in Göttingen bestellt, diese in einer neu aufgebauten und modifizierten Anlage angezüchtet, eine  $^{15}\text{N}$ -Markierung durchgeführt und erneut ausgewertet. Für die Auswertung werden dieses Mal nur die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten der ATP-Synthase verwendet, da sie sich zuverlässig auch in geringen Mengen durch PMF identifizieren lassen, und sie zudem groß genug sind, um nach dem Trypsinverdau viele Peptid-Isotopomerenpaare zu liefern. Es ergibt sich hier ein Wert von **2,8** was einer Abweichung von nur 12% im Vergleich zum vorangegangenen Experiment entspricht.

---

### 5.1.5 Diskussion

Die Experimente bestätigen, dass sich die Regulierung der Dimerisierung von mitochondrialer und chloroplastidischer ATP-Synthase ( $MF_0F_1$  und  $CF_0F_1$ ) grundlegend unterscheidet, und dass die Bildung von  $CF_0F_1$ -Dimeren in *Chlamydomonas reinhardtii* metabolisch kontrolliert wird. Hier, wie auch in verschiedensten anderen in dieser Hinsicht untersuchten Organismen, wie Pilzen (Arnold et al., 1998b; Krause et al., 2006), Säugern (Schägger and Pfeiffer, 2000; Schägger, 2002; Reifschneider et al., 2006; Schäfer et al., 2006), anderen Tieren und höheren Pflanzen (Eubel et al., 2003; Eubel et al., 2004a; Krause et al., 2004a) bildet der mitochondriale Komplex Dimere, die wahrscheinlich noch wesentlich größere Strukturen bilden können und mit für die Struktur der Cristae in den Mitochondrien verantwortlich sind. So wurden in Rattenhirn und -leber zwischen 50% und 64% Dimer-Anteil gemessen (Frenzel, 2007; Thilmany, 2008). Im Extremfall *Chlamydomonas reinhardtii* ist sogar die gesamte mitochondriale ATP-Synthase zu Dimeren assoziiert (van Lis et al., 2003; Rexroth et al., 2004). Es steht also außer Zweifel, dass im Falle der mitochondrialen ATP-Synthase das Dimer eine aktive Form darstellt. Das  $CF_0F_1$ -Dimer dagegen erfüllt dagegen höchstwahrscheinlich keine strukturgebende Funktion, wie schon vermutet wurde, da die Thylakoidmembran keine so ausgeprägte Krümmung aufweist wie die innere Membran der Mitochondrien (Dudkina et al., 2006). Das Dimer ist so wenig stabil, dass es nur unter schonenden Aufschlussbedingungen und einem milden Detergens aus der Membran isoliert werden kann. Schon eine Behandlung der Zellen unter hohem Druck wie in der French Press führt zum Zerfall der Dimere (Rexroth, 2004; Schwassmann, 2004). Desweiteren deutet die Dissoziation der Dimere unter steigender Phosphatkonzentration darauf hin, dass sie eine regulatorische Funktion besitzen könnten, die durch die Phosphationen gesteuert wird.

Die Konzentration an Phosphat im Stroma der Chloroplasten ist veränderlich (Sharkey and Vanderveer, 1989), und könnte in der Nähe der ATP-Synthase und der negativ geladenen Membran noch niedriger liegen als im übrigen Stroma, was eine Dimerisierung begünstigen könnte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Dimerisierung der ATP-Synthase auch von anderen Faktoren beeinflusst wird, wie z.B. der Zusammensetzung der Stromamembran.

---

Für eine *Chlamydomonas reinhardtii*-Zelle und auch für andere Pflanzen ist eine Möglichkeit zur Regulation der ATP-Produktion mit Sicherheit von großem Nutzen. Durch die schwankenden Bedingungen, denen die Zelle ausgesetzt ist, ist eine schnelle Anpassung an die Umgebungsbedingungen überlebenswichtig. Es ist daher anzunehmen, dass die ATP-Produktion, die ja in diesem Organismus sowohl in den Chloroplasten als auch in den Mitochondrien stattfindet, auf eine Art reguliert wird, die unabhängig von einer *de novo* Synthese der entsprechenden Proteinkomplexe funktioniert. Diese würde eine längere Zeit in Anspruch nehmen und die Zelle durch höhere „Materialkosten“ belasten. Während sich die Menge der mitochondrialen ATP-Synthase in der photomixotrophen Anzucht im Vergleich zur photoautotrophen Anzucht deutlich erhöht, bleibt die Menge an chloroplastidischer ATP-Synthase unter diesen beiden sehr unterschiedlichen Bedingungen doch relativ konstant, wobei sich aber in der photomixotrophen Anzucht der Dimer-Anteil deutlich erhöht. Aus diesen Gründen kann vermutet werden, dass das Dimer der ATP-Synthase in den Chloroplasten eine inaktive Form darstellt, mit der die Zelle die Aktivität dieser Proteinkomplexe inhibiert. Damit würde sich die Funktion des Chloroplasten-ATP-Synthase Dimers grundlegend von den mitochondrialen Dimeren unterscheiden. Somit steht ihre Existenz auch nicht im Widerspruch zu den von Dudkina et al. (2006) für mitochondriale ATP-Synthase-Dimere postulierten Eigenschaften. Dort wurde angemerkt, dass sich die Dimerisierung der ATP-Synthase auf Mitochondrien beschränkte, da die Thylakoidmembran der Chloroplasten weniger ausgeprägte Invaginationen besitzt, sondern vielmehr geldrollenartige Grana bildet, deren Oberfläche sich zu einem großen Teil gerade erstreckt.

Ein möglicher struktureller Unterschied zwischen ATP-Synthase Dimeren der Chloroplasten und denen der Mitochondrien liegt in der Position der Dimerisierungsstelle. Die chloroplastidischen Dimere zerfallen unter steigender Phosphat-Konzentration. Die Bindestelle für Phosphat an der ATP-Synthase befindet sich am  $F_1$  Teil des Proteinkomplexes. Es könnte also sein, dass die Chloroplasten-ATP-Synthase über ihren stromaständigen  $F_1$  Teil anstatt wie die mitochondriale ATP-Synthase nur oder zumindest hauptsächlich über den  $F_0$  Subkomplex und Dimer-spezifische Untereinheiten dimerisiert, wie auch die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen (siehe Abbildung 5.1). Dass die Bindestellen der zwei ATP-Synthase Spezies

---

unterschiedlich sind, ist aufgrund ihrer vermutlich unterschiedlichen Funktion und Stabilität wahrscheinlich. Trotzdem ist es möglich, dass auch der  $F_0$  Teil an der Dimerisierung der chloroplastidischen ATP-Synthase beteiligt ist. Auch die Existenz von Dimer-Spezifischen Untereinheiten kann nicht mit Gewissheit ausgeschlossen werden, obwohl bisher keine entdeckt werden konnten. Ein Nachweis zu beiden Punkten könnte z.B. über crosslinking-Experimente oder auch über eine elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse der Dimere erfolgen, diese jedoch ist aufgrund der geringen Stabilität des Superkomplexes nur schwer durchführbar.

Die quantitative Untersuchung der ATP-Synthasen aus einzelligen Organismen durch die Markierung mit stabilen Isotopen (Oda et al., 1999; Conrads et al., 2001; Schwassmann et al., 2007) hat sich als eine genaue, reproduzierbare Methode herausgestellt. Die hier vorgestellten Ergebnisse aus der Isotopenmarkierung bestätigten die Werte aus der hier ebenfalls beschriebenen herkömmlichen, densitometrischen Untersuchung, auch im Hinblick auf die bei dieser Methode üblichen Messfehler. Bei der Untersuchung von Proteininteraktionen beinhaltet jede einsetzbare densitometrische Methode, bei der eine Färbung der Proteine im nativen Gel durchgeführt wird, einen Fehler bedingt durch die Tatsache, dass bei der Zusammenlagerung von Proteinen unterschiedliche Anteile der Oberfläche für die Farbe zugänglich sind. In diesem Fall ist durch die Dimerisierung der ATP-Synthase ein Teil der Proteinoberfläche, dort wo sich die ATP-Synthasen berühren, für den Farbstoff unzugänglich und die Farbstoffmoleküle lagern sich nicht an. Auf diese Weise wird das Ergebnis verfälscht. Anders bei der stabilen-Isotopenmarkierung: Hier ist die Markierung Bestandteil der Proteine, unabhängig davon, wie groß eventuell vorhandene Kontaktflächen zwischen ihnen sind.

Desweiteren gibt es die Möglichkeit, ganze, enzymatisch nicht gespaltene Proteine direkt zu quantifizieren (insofern nicht wie in diesem Fall Monomer und Dimer des gleichen Komplexes verglichen werden sollen). Dann nämlich kann der Komplex über eine Chromatografie aufgereinigt werden, ohne vorher eine BN-Gelanalyse durchzuführen, und die Proteine können direkt nach der HPLC massenspektrometrisch untersucht werden. Bei guter Probenreinheit produzieren dann Proteine aus  $^{14}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$  Kultur einzelne Signale, deren Flächeninhalt



---

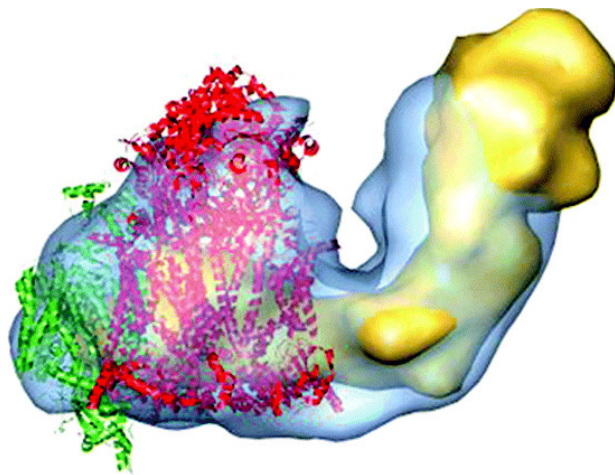
verglichen wird. Diese Signale hätten zwar eine Überschneidungsfläche, aber mit einer gut optimierten Chromatographie wäre wahrscheinlich die Auflösung hoch genug, so dass sich die Flächen unter den Kurven (AUCs) für beide Signale berechnen lassen.

Insgesamt ist diese Methode sehr interessant, sie besitzt ein hohes Anwendungspotenzial vor allem für Einzeller, Bakterien und generell Organismen mit niedriger Generationszeit, da bei ihnen die vollständige Isotopenmarkierung relativ einfach ist. Hier bietet die Stabile-Isotopenmarkierung eine gute Möglichkeit, auch mit wenig Material Proteine genau zu quantifizieren. Fehler, die durch die getrennte Aufarbeitung der verschiedenen Proben entstehen, werden völlig vermieden.

---

## 5.2 Atmungskettensuperkomplexe aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Über die Anordnung der Atmungskettenkomplexe der inneren Mitochondrienmembran herrscht derzeit Uneinigkeit. Jahrzehntlang wurde angenommen, dass die einzelnen Komplexe lateral frei in der Membran diffundieren. Dieses „random collision“-Modell wurde durch Ergebnisse gestützt, die die Kinetik der Elektronenübertragung und des sogenannten „Poolverhaltens“ der Elektronencarrier Ubiquinon und Cytochrom c beschreiben (Hackenbrock et al., 1986). Darüber gerieten schon viel früher bekannte Hinweise in Vergessenheit, die auf eine Zusammenlagerung der einzelnen Komplexe zu quintären Strukturen, engl. „quinary“ (Edelstein, 1980; Velot et al., 1997) oder „quintenary“ (Eubel et al., 2004b), sogenannten „Superkomplexen“, hinwiesen (Chance and Williams, 1955). Dieses dem „random collision“ Modell widersprechende „solid state“ Modell wurde erst 2000 durch Untersuchungen mittels BN-PAGE, entwickelt von Schägger et al., wieder langsam populär, als Superkomplexe in der Atmungskette von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Rind (*Bos taurus*) entdeckt wurden (Schägger and Pfeiffer, 2000). Diese Superkomplexe bestanden in Fall von Rind aus den Komplexen I, einem Dimer aus Komplex III und null bis vier Exemplaren von Komplex IV, und im Fall von Hefe, die keinen Komplex I besitzt, aus den Komplexen III und IV (siehe Kapitel 2.4). Darüber hinaus fanden sich Dimere und größere Oligomere von Komplex V, der ATP-Synthase. In den folgenden Jahren wurde die BN-PAGE zu einer häufig genutzten Methode, um die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe bzw. deren Aktivität und Interaktion miteinander zu untersuchen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung von durch BN-PAGE und Elektroelution gewonnenen Superkomplexen aus Rinderherz brachte erste 2D Bilder der Atmungsketten-Superkomplexe a ( $I_1III_2$ ) und b ( $I_1III_2IV_1$ ) (Schäfer et al., 2006) sowie eine 3D Projektion von Superkomplex b (Schäfer et al., 2007) (siehe Abbildung 5.8).



**Abbildung 5.8: Atmungskettensuperkomplex  $I_1III_2IV_1$  aus Rinderherzmitochondrien.** Die Darstellung kombiniert die elektronenmikroskopischen Projektionen des einzelnen Komplexes I und des Superkomplexes b mit Röntgenstrukturen des Komplex III Dimers und Komplex IV. Komplex I ist gelb, das Komplex III Dimer rot und Komplex IV grün dargestellt. Die blauen Umrisse entsprechen der Form des Superkomplexes nach der Einzelpartikel-analyse des Gesamtkomplexes. (Schäfer et al., 2007)

Atmungsketten-Superkomplexe von Pflanzen wurden zuerst in nicht-grünen Pflanzenteilen von *Arabidopsis thaliana*, Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) gefunden (Eubel et al., 2003), bald danach auch in den grünen Blättern von Spinat (*Spinacia oleracea*) (Krause et al., 2004a). In beiden Untersuchungen wurde ein- und zweidimensionale BN-PAGE, im Fall von Spinat auch CN-PAGE benutzt. Der Superkomplex  $I_1III_2$  war, diesen Untersuchungen zufolge, in den untersuchten Pflanzenteilen der am häufigsten vorkommende und der stabilste. Ebenso wurde ein besonders großer Superkomplex der Stöchiometrie  $I_2III_4$  (Eubel et al., 2004a) beschrieben, der jedoch nur in geringen Mengen vorhanden war. Dimere der mitochondrialen ATP-Synthase waren zwar vorhanden, aber auf den Gelen nur schwach zu sehen. In Spinat und in Kartoffel (Eubel et al., 2004a) wurden außerdem Assoziationen verschiedener Stöchiometrien der Komplexe III und IV gefunden, wie  $III_2IV_1$  und  $III_2IV_2$ . Eine Beteiligung von Komplex II oder den in Pflanzen vorkommenden alternativen Oxidoreduktasen oder alternativen Oxidasen wurde in keinem Fall beobachtet. Im Vergleich zu den in tierischen Zellen gefundenen Superkomplexen tauchte erstaunlicherweise der in Rind außerordentlich stabile Superkomplex  $I_1III_2IV_1$  (Superkomplex b) oder auch andere „Respirasomen“ nicht oder nur in geringen Mengen auf.

Anders als tierische Zellen besitzen Pflanzenzellen eine Zellwand, die harschere Aufschlussmethoden erfordern. Ein solcher Aufschluss kann die Gewinnung von Superkomplexen erschweren oder verhindern, da diese anfällig für mechanischen Stress sein können. So könnten die Superkomplexe schon vor der Solubilisierung

---

beschädigt werden und würden nach einer noch so schonenden Vorgehensweise doch nicht gefunden werden.

Der *Chlamydomonas reinhardtii* Mutante cw 15 fehlt eine stabile Zellwand. Sie eignet sich aus diesem Grund besonders gut für die Untersuchung von Atmungsketten-Superkomplexen, da schonende Aufschlussmethoden hier den Erhalt intakter Superkomplexe ermöglichen.

### 5.2.1 Untersuchungen im blau-nativen Gel

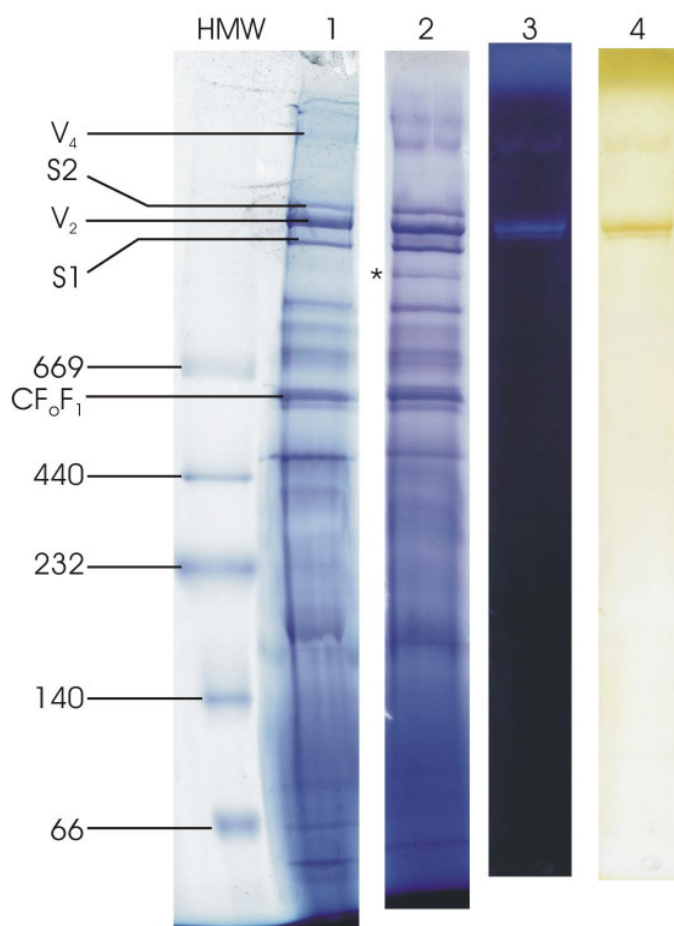
*Chlamydomonas reinhardtii* Zellen werden wie in den Kapiteln 4.4 und 4.6 beschrieben angezüchtet. Da die Mitochondrien untersucht werden sollen, wird die Kultur unter photomixotrophen Bedingungen gehalten, da man hier mehr dieser Organellen gewinnen kann als aus unter photoautotrophen Bedingungen angezüchteten Algen. Von einer rein heterotrophen Anzucht im Dunkeln wird abgesehen, da die Zellen dabei schnell von Bakterien befallen werden und bisher nur eine geringe Ausbeute erzielt werden konnte.

Die Mitochondrien werden mit Digitonin solubilisiert und das Solubilisat auf ein BN-Gel aufgetragen, wie in Kapitel 4.7 und 4.8.1 beschrieben. Bei der Untersuchung von Atmungsketten-Superkomplexen aus Spinat war aufgefallen, dass bei einer Solubilisierung mit Digitonin die mitochondrialen Komplexe in Lösung gehen, während die Chloroplastenmembran intakt zu bleiben scheint (Krause et al., 2004a). Für die *Chlamydomonas*-Proben trifft das nicht zu. Gründe hierfür könnten in der unterschiedlichen Struktur der Thylakoidstapel oder in einer unterschiedlichen Lipidzusammensetzung der Chloroplastenmembranen der beiden Organismen liegen. Bei der Solubilisierung der *Chlamydomonas*-Mitochondrien-Probe, die auch immer einen Anteil an Chloroplasten beinhaltet, entsteht ein grünliches Solubilisat und ein dunkelgrünes Pellet. Wie auch in Kapitel 5.1 beschrieben, solubilisiert Digitonin die Thylakoid-Membranproteine aus *Chlamydomonas* problemlos. Es kann also bei diesem Organismus nicht davon ausgegangen werden, dass die mitochondrialen Proteine mit diesem Detergens leichter aus ihrer Membran gelöst werden als die der Chloroplasten. Für die an *Chlamydomonas* durchgeführten Untersuchungen wird eine Digitoninkonzentration von nur 1,5% (w/v) verwendet, da sich diese als optimal zur

---

Solubilisierung der Chloroplastenkomplexe erwiesen hat (Schwassmann, 2004). Bei der eingesetzten konstanten Proteinmenge, gemessen am Chlorophyllgehalt, entspricht das ungefähr einem Protein/Digitonin-Verhältnis von 1:5,4 (w/w). Um zu überprüfen, ob die Solubilisierungsbedingungen für die Gewinnung von Superkomplexen optimal sind, werden Solubilisierungen der Mitochondrienprobe mit 1% und 2% Digitonin bei gleicher Proteinmenge durchgeführt. Das entspricht jeweils einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 1:3,6 und 1:7,3 (w/w). Die Solubilisate werden auf ein BN-Gel aufgetragen. Es zeigt sich, dass bei einer Detergens-Konzentration von 1% (w/v) die Proteinbanden im Gel unschärfer werden und sich Präzipitate bilden. Bei 1,5% und 2% dagegen ist die Trennung gut, und die Superkomplexbanden sind deutlich sichtbar (Bilder und ausführliche Beschreibung siehe Eva R. Schäfer, 2005). Da jedoch schon mehrfach beobachtet wurde, dass Superkomplexe bei hoher Digitoninkonzentration zerfallen können, wird für die weiteren Experimente mit einer Digitoninkonzentration von 1,5% gearbeitet.

Für die Auftrennung der Atmungskettenkomplexe und eventuell vorhandener Superkomplexe wird zunächst ein BN-Gel mit einer Acrylamidkonzentration von 3 bis 14 % verwendet, um die Auftrennung im hohen Massenbereich zu überprüfen. Außerdem wird untersucht, ob der Coomassie-haltige Auftragspuffer einen Einfluss auf die Stabilität der Superkomplexe hat. Dazu wird er in Spur 1 nicht verwendet, in Spur 2 und allen übrigen dagegen schon. Die Spuren 1 und 2 sowie der HMW-Marker des Gels werden nach dem Gellauf mit Coomassie nachgefärbt (siehe Abbildung 5.9). Spur drei wird einem Aktivitätstest für Komplex V unterzogen (siehe Kapitel 4.9.3).



**Abbildung 5.9: BN-PAGE einer angereicherten Mitochondrienfraktion aus *Chlamydomonas reinhardtii*.** Der HMW-Marker gibt die apparente Molekularmasse in kDa an. Die Spuren eins und zwei wurden nach dem Gellauf jeweils mit Coomassie nachgefärbt. In Spur eins wurde anders als in Spur zwei kein Auftragspuffer verwendet. Spur drei zeigt die gleiche Probe nach einem Aktivitätstest für ATPase. Vier zeigt dieselbe Spur mit invertierter Färbung. V<sub>4</sub> – Tetramer der mitochondrialen ATP-Synthase; V<sub>2</sub> – Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase; S<sub>1</sub> und S<sub>2</sub> – unbekannte Superkomplexe; CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> – Chloroplasten-ATP-Synthase; \* Dimer der chloroplastidischen ATP-Synthase

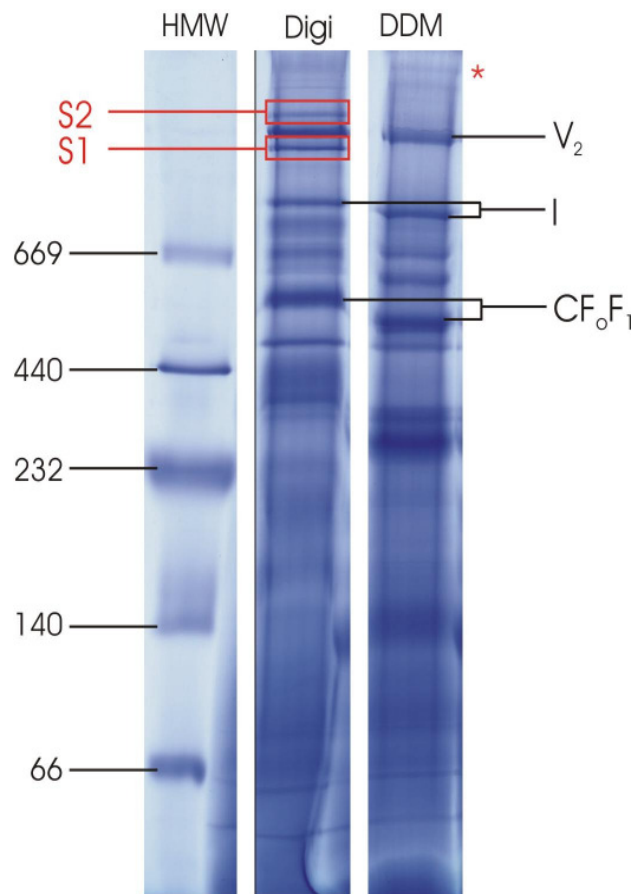
In den Spuren eins und zwei fallen neben des bereits bekannten mitochondrialen ATP-Synthase-Dimers (V<sub>2</sub>) zwei weitere Superkomplexe in unmittelbarer Nähe auf (S<sub>1</sub> und S<sub>2</sub>). Ihre Bestandteile zu klären wird Gegenstand der folgenden Untersuchungen sein. Im höheren Massenbereich oberhalb von V<sub>4</sub> ist zusätzlich eine etwas diffuse Bande zu sehen. Noch weiter oben im Gel, wo es extrem weich ist, sind in Spur eins Präzipitate zu erkennen. Es ist keine negative Auswirkung des Auftragspuffers auf die Stabilität der Superkomplexe sichtbar, im Gegenteil ist das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase in der Spur ohne Auftragspuffer kaum zu sehen. Dafür kommt es jedoch in der Spur ohne Auftragspuffer zu einer leichten Präzipitatbildung im höchsten Massenbereich. In dieser Region kommt es zwar in BN-Gelen häufiger zur Präzipitation, abhängig von der aufgetragenen Proteinmenge; dennoch ist es interessant, dass offensichtlich mehr Protein in eine Spur einlaufen kann, wenn Auftragspuffer, der zusätzliches Coomassie enthält, verwendet wird. Eine weitere Auffälligkeit ist die Bande des chloroplastidischen ATP-Synthase Dimers (zwischen

---

den Spuren eins und zwei mit \* gekennzeichnet). Sie ist in Spur zwei deutlich stärker gefärbt als in Spur eins, wo sie kaum sichtbar ist. Der Aktivitätstest auf ATPase-Aktivität von Spur drei bzw. vier zeigt eine deutliche Bande an der Position von V<sub>2</sub> und eine schwächere und diffusere Bande weiter oben. Am oberen Rand des Gels ist ebenfalls eine Färbung zu sehen, die jedoch als Artefakt angesehen werden muss, da sich dort kein Protein anfärben ließ. Erwartungsgemäß sind keine Aktivitätsbanden an den Positionen der Chloroplasten-ATP-Synthase zu sehen, da sie auf diesen speziellen Aktivitätstest nur anspricht, wenn zuerst die Untereinheit Epsilon durch z.B. Taurodesoxycholat, Natriumcholat oder Octylglycosid abgespalten wird (Suhai, 2008b). Bei Spur vier handelt es sich um dieselbe wie Spur drei, nur werden hier zur besseren Kenntlichmachung der Banden die Farben invertiert dargestellt.

Sollen die zu untersuchenden Superkomplexe in einer weiten blau-nativen Gel-Dimension in ihre Einzelkomplexe getrennt werden, muss zunächst geprüft werden, welches Detergens geeignet ist. Bisher wurde unter anderem in unserem Labor in dieser Methode Dodecylmaltosid (DDM) eingesetzt, das sich schon bei der Untersuchung von chloroplastidischen Komplexen aus *Chlamydomonas reinhardtii* als wirkungsvoll erwiesen hat (Schwassmann, 2004). Mitochondrienproben werden mit DDM (1% w/v) und - als Referenz - mit Digitonin (1,5% w/v) solubilisiert und auf ein BN-Gel aufgetragen (Abbildung 5.10).

Wie erwartet sind im Digitoninsolubilisat oberhalb und unterhalb des Dimers von Komplex V deutlich die Banden zweier Superkomplexe zu sehen, wie bereits in Abbildung 5.9. Im DDM-Solubilisat (Abbildung 5.10) fehlen diese beiden Banden; das Detergens hat also die Superkomplexe zerfallen lassen. Im sehr hohen Massenbereich beider Spuren sind schwache Banden zu erkennen (gekennzeichnet durch ein \*). Eine dieser Banden stellt eine Assoziation von mehreren Komplexen V dar, wie der Aktivitätstest zeigte. Eine BN-Gelspur mit DDM Solubilisat wird für eine zweite Dimension verwendet, in der die Protein-Untereinheiten in einem SDS-Gel aufgetrennt werden. In diesem Gel sind auf der Laufstrecke der Proteine aus den schwachen Banden keine Banden sichtbar, auch nicht nach einer Silberfärbung (ohne Abbildung). DDM ist demnach für eine zweite, blau-native Gel-Dimension, in der die Superkomplexe S1 und S2 in ihre individuellen Komplexe aufgetrennt werden sollen, geeignet.



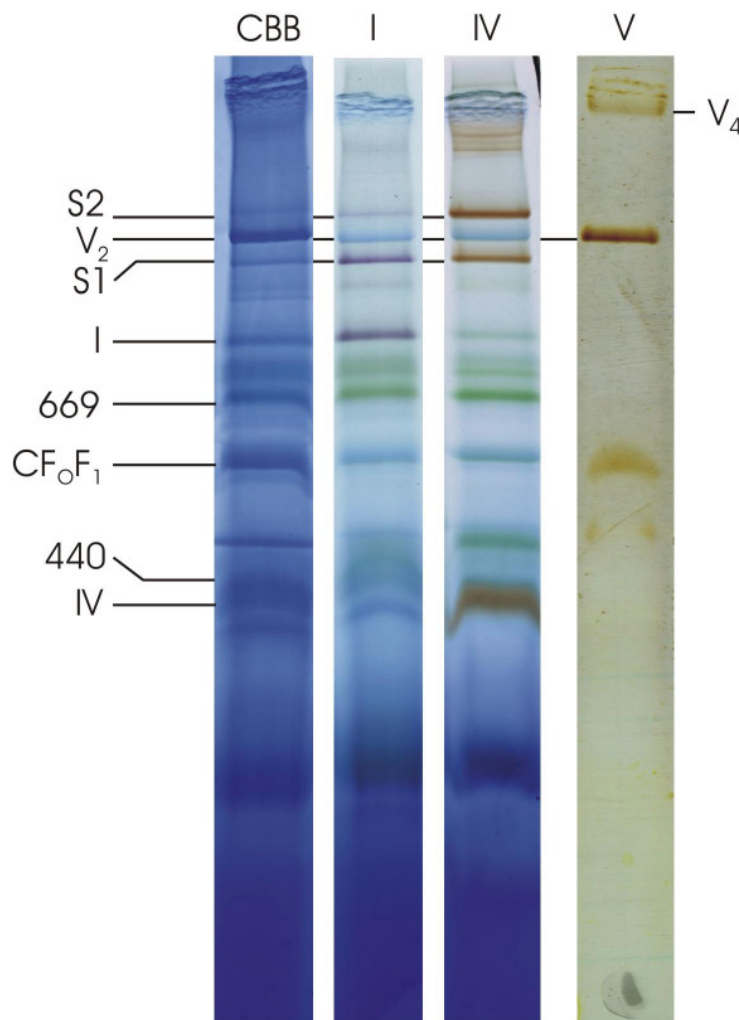
**Abbildung 5.10: BN-PAGE von Digitonin und DDM Solubilisierungen einer Mitochondrienprobe aus *Chlamydomonas reinhardtii*.** Die Solubilisierung mit Digitonin enthält zwei Superkomplex-Banden (rote Kästen), die in einem Massenbereich ähnlich des mitochondrialen ATP-Synthase Dimers liegen (V<sub>2</sub>). In der mit DDM solubilisierten Probe fehlen diese Banden. In beiden Solubilisaten zeigen sich außerdem sehr schwache Banden im noch höheren Massenbereich (roter \*). Die Laufhöhe variiert stark zwischen DDM und Digitoninsolubilisat, gezeigt am Beispiel von CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>. HMW- High Molecular Weight Marker, Digi- Digitoninsolubilisat, DDM- Dodecylmaltosidsolubilisat, V<sub>2</sub>- Komplex V-Dimer, I- Komplex I, CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Chloroplasten-ATP-Synthase. Angaben der apparenten Molekularmassen in kDa. Die apparente Molmasse wird vom verwendeten Detergens beeinflusst.

Die Zusammensetzung der möglichen Atmungsketten-Superkomplexe S1 und S2 wird zuerst durch Aktivitätstests (Kapitel 5.2.2), dann durch die Auftrennung der Proteinbanden in verschiedenen zweiten Gel-Dimensionen untersucht (Kapitel 5.2.3 und 4). Nach den bisherigen Erkenntnissen über Atmungskettensuperkomplexe werden dabei vor allem die NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I), Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) und Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) als potenzielle Bestandteile der Superkomplexe vermutet.



### 5.2.2 Aktivitätstests

Für die Atmungskettenkomplexe I, II, IV, V und neuerdings III (Wittig et al., 2007, nach Abschluss der unten beschriebenen Experimente) stehen in-Gel-Aktivitätstests zur Verfügung. Diese Tests geben zwar keinen Aufschluss darüber, ob ein solcher Komplex vollständig und in seiner nativen Form vorliegt, da sie nur jeweils eine vom Komplex katalysierte Teilreaktion nachweisen. Sie sind dennoch nützlich, um die Position der einzelnen Komplexe in Gel anzuzeigen (siehe Abbildung 5.9), und um zu zeigen, dass die Proteine im Gel keinen denaturierenden Bedingungen, z. B. Wärme oder einer irrtümlich zu hohen Konzentration an Detergens, ausgesetzt waren.

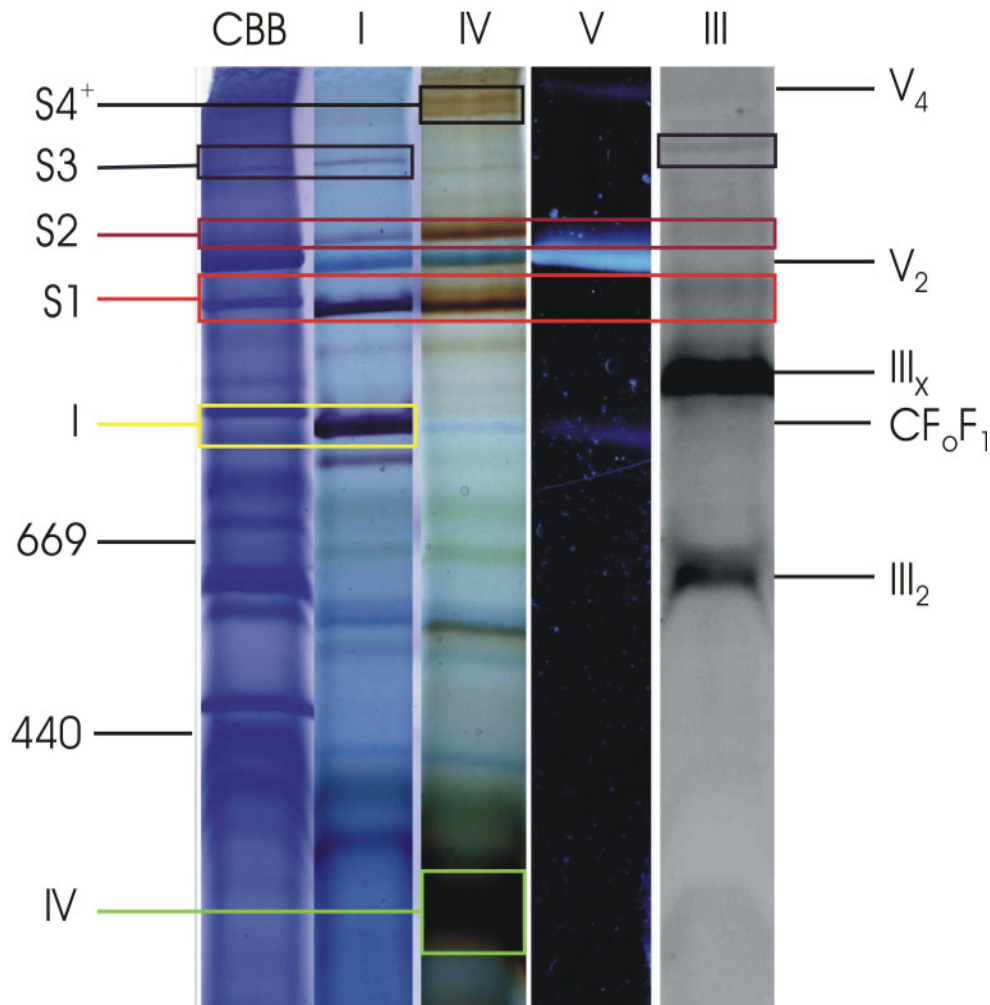


**Abbildung 5.11: Blau-native PAGE, 3% bis 8% Totalacrylamid, von Digitoninsolubilisat (1,5% w/v) der Mitochondrienfraktion aus *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Die Spuren wurden mit colloidalem Coomassie nachgefärbt (CBB) oder Aktivitätstests für die Atmungskettenkomplexe I, IV und V unterzogen. Der Aktivitätstest für Komplex I zeigt außer dem individuellen Komplex seine Beteiligung an beiden Superkomplexen S1 und S2. Das gleiche gilt für Komplex IV. Der Aktivitätstest für Komplex V zeigt zwei Banden, die dem Dimer und Tetramer des Komplexes zugeordnet werden können, sowie eine schwache Bande im Bereich der Chloroplasten-ATP-Synthase. Alle diese Banden mit Ausnahme des Komplex V Tetramers sind auch in der Coomassie-gefärbten Spur zu sehen. Apparente Molmassen in kDa.

---

Die Integrität der Probe ist vor allem dann wichtig, wenn die sie für elektronenmikroskopische Untersuchungen genutzt werden soll (siehe Kapitel 5.2.6). Für die Aktivitätstests wird eine BN-PAGE von Digitoninsolubilisat einer *Chlamydomonas reinhardtii* Mitochondrienprobe durchgeführt. Es wird ein Gel mit einem Totalacrylamidgradienten von 3 bis 8% verwendet. Sofort nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel zerteilt und jeweils eine Spur einem Aktivitätstest für Komplex I, II, IV und V unterzogen. Der Aktivitätstest für Komplex II gleicht dem für Komplex I (siehe Kapitel 4.9.1), nur dass als Substrat statt NADH Succinat verwendet wird. Eine weitere Spur wird mit colloidalem Coomassie nachgefärbt. Der Aktivitätstest für Komplex II zeigt, wie erwartet, keine Aktivität im Bereich der Superkomplexe an (ohne Abbildung). Die Aktivitätstests der Komplexe I und IV jedoch führen zu einer Verfärbung der beiden Superkomplexbanden S1 und S2, ebenso wie zur Anfärbung der individuellen Komplexe (siehe Abbildung 5.11). Der Aktivitätstest für Komplex IV zeigt außerdem zwei weitere Banden im Bereich oberhalb der Superkomplexe S1 und S2. Der Komplex I Aktivitätstest zeigt eine sehr schwache Bande im gleichen Bereich. Diese Banden entstehen vermutlich durch das Vorhandensein von sehr großen Superkomplexen, die jedoch nur in sehr geringer Menge vorhanden sind. Wie schon in Abbildung 5.9 sind nach einem Komplex V-Aktivitätstest zwei Banden der mitochondrialen ATP-Synthase zu sehen, die ihrer apparenten Molekularmasse nach dem Dimer und dem Tetramer dieses Komplexes zugeordnet werden können. Für Komplex III ist zum Zeitpunkt der Experimente kein In-Gel-Aktivitätstest bekannt, aus diesem Grund wird ein Antikörpertest durchgeführt. Zu diesem Zweck wird eine BN-PAGE durchgeführt. Je eine Spur wird für Aktivitätstests auf Komplex I, IV und V verwendet, eine Spur wird mit colloidalem Coomassie nachgefärbt, und eine Spur wird auf eine PVDF-Membran geblottet, mit Antikörpern gegen Komplex III markiert und nach der Zweitantikörpermarkierung die Chemolumineszenz detektiert (siehe Abbildung 5.12).



**Abbildung 5.12:** Blau-native PAGE, 3 bis 10% Totalacrylamid, von Mitochondrien aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Spuren sind mit Coomassie nachgefärbt (CBB), Aktivitätstests für Komplexe I, IV und V unterzogen (I, IV und V) oder mit Antikörpern gegen Komplex III behandelt worden (III). Die Aktivitätstests zeigen im Vergleich zu Abbildung 5.11 die gleiche Färbung im Bereich der Superkomplexe und dienen deren besserer Zuordnung. Die Antikörpermarkierung zeigt schwache Signale im Bereich beider Superkomplexe S1 und S2. Der individuelle Komplex III, bzw. sein funktionales Dimer, ist deutlich stärker gefärbt, ebenso wie eine Bande unklarer Stöchiometrie bei etwa 1000 kDa, hier mit III<sub>x</sub> bezeichnet. Angabe der apparenten Molmasse des HMW in kDa. HMW – High Molecular Weight Marker.

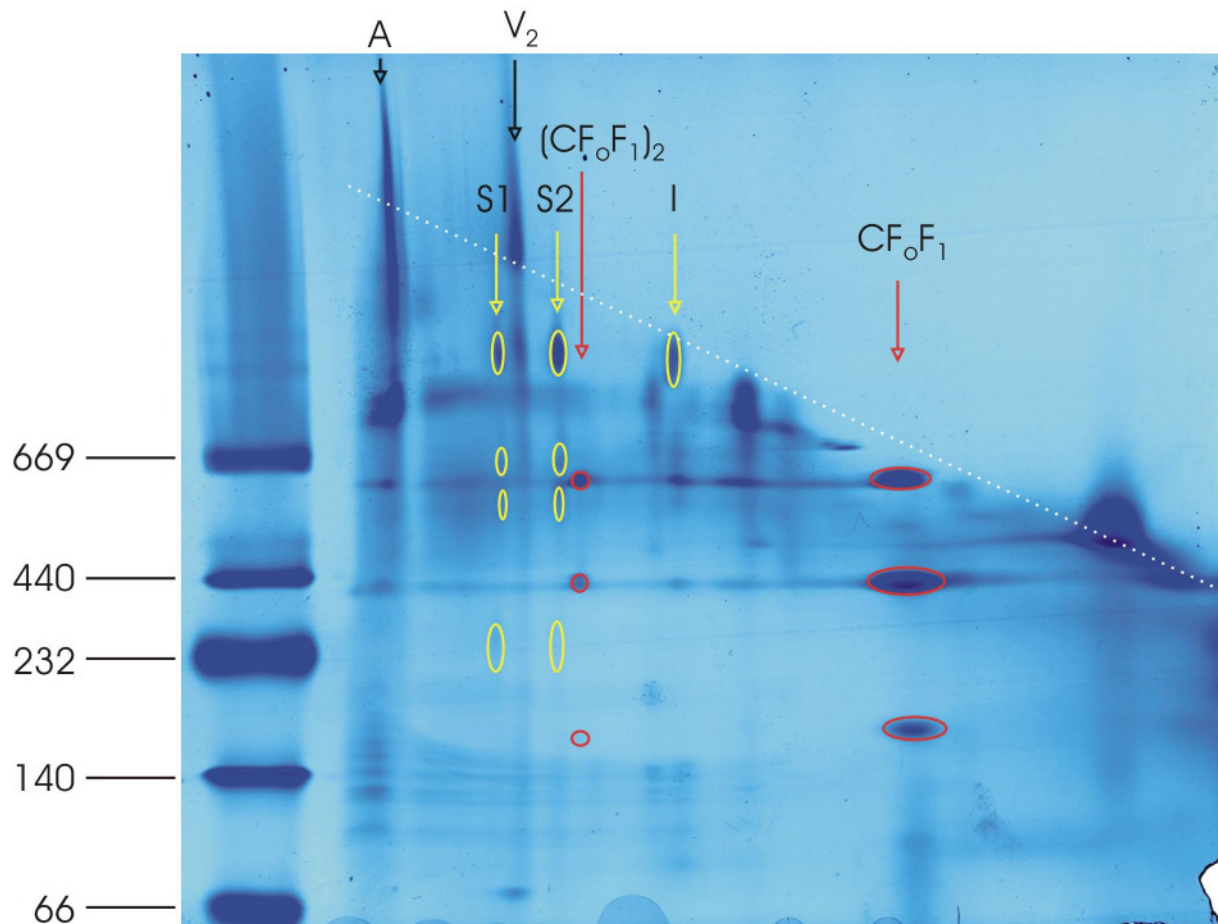
Der Antikörper gegen Komplex III hat auf der PVDF-Membran an vier unterschiedlichen Positionen gebunden. Zwei sehr schwache Banden markieren die Superkomplexe S1 und S2. Diese Superkomplexe bestehen, will man die schwachen Banden als positives Ergebnis deuten, demnach aus den Komplexen I, III und IV. Eine starke Bande im Bereich knapp oberhalb von Komplex I kann entweder auf eine

---

Zusammenlagerung zweier Komplex III Dimere, auf eine Assoziation von Komplex III<sub>2</sub> mit einem anderen Komplex oder auf eine falschpositive Markierung zurückgeführt werden. Komplex III<sub>2</sub> schließlich stellt die unterste Bande dar; da Komplex III in seiner funktionsfähigen Form ein Dimer ist, war keine Bande für eine monomere Form zu erwarten.

### 5.2.3 Zweidimensionale Gelanalyse mit 2D BN/BN Gelen

Die zweidimensionale BN-Analyse kann Aufschluss darüber geben, welche und wie viele verschiedene Atmungskettenkomplexe in einem Superkomplex enthalten sind. Hier werden die Interaktionen zwischen den einzelnen Komplexen durch die Zugabe eines relativ milden Detergens, Dodecylmaltosid, aufgehoben (siehe Abbildung 5.10), während die individuellen Atmungskettenkomplexe selber vermutlich intakt bleiben. Um einen vollständigen Zerfall der Proteinkomplexe zu vermeiden, wird der Gellösung der zweiten Dimension lediglich eine geringe Konzentration von 0,02% DDM beigemischt. Die zwei Gel-Dimensionen bestehen aus ansonsten identischen blau-nativen Gelen, jeweils mit einem Totalacrylamidgradienten von 3% bis 8%.



**Abbildung 5.13: Zweidimensionale BN/BN-Gelelektrophorese von angereicherten Mitochondrien aus *Chlamydomonas reinhardtii*.** Das Gel und der Elektrophoresepuffer enthalten 0,02% (w/v) DDM, um einen Zerfall der Superkomplexe zu bewirken. Auf einer Diagonalen (weiße Punkte) liegen die Komplexe, die in der zweiten Gel-Dimension nicht zerfallen sind, wie Komplex I und der größte Teil des Komplex V Dimers. Die Superkomplexe S1 und S2 dagegen sind zerfallen. Man erkennt deutlich Komplex I als Bestandteil, sowie einige andere, für beide Superkomplexe identische Bestandteile. Ebenfalls sichtbar sind Monomer und Dimer der chloroplastidischen ATP-Synthase. Erste Gel-Dimension mit 3% bis 13%, zweite Gel-Dimension mit 3% bis 8% Totalacrylamid.

Durch das DDM dissoziieren einige der Superkomplexe, während andere ihre Struktur behalten. Auf einer ungefähren Diagonalen (weiße gepunktete Linie in Abbildung 5.13) liegen die Komplexe, die in der ersten und der zweiten Dimension gleich gelaufen sind, und somit durch das DDM nicht weiter dissoziieren. Dazu gehört das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase, in der Abbildung mit  $V_2$  bezeichnet, sowie ein Teil des Monomers der chloroplastidischen ATP-Synthase, die präparationsbedingt ebenfalls in der Probe enthalten ist. Das Dimer dieses Komplexes  $(CF_oF_1)_2$  allerdings

---

ist vollständig zerfallen, und zeigt so in der Vertikalen ein dem Monomer identisches Bandenmuster. Es zerfällt in den Monomeren Komplex  $CF_oF_1$ , der in diesem Gel eine apparente Masse von etwa 550 kDa besitzt, und, genau wie  $CF_oF_1$  der ersten Gel-Dimension, in zwei Subkomplexe von etwa 400 und 150 kDa. Diese Übereinstimmung der Dissoziationsprodukte zeigt, dass es sich um Monomer und Dimer des gleichen Komplexes handelt. Die Superkomplexe S1 und S2 zerfallen in der zweiten Gel-Dimension in vier größere (gelbe Markierung in Abbildung 5.13) und eine Vielzahl von kleinen Subkomplexen oder Proteinuntereinheiten. Eine Übereinstimmung des größten Subkomplexes von S1 und S2 mit der Bande des nicht zerfallenen individuellen Komplexes I fällt auf. Genauere Hinweise darauf, welche Komplexe außer Komplex I noch Bestandteil von S1 und S2 sind, kann man allerdings aus dieser Untersuchung nicht ableiten. Es kann jedoch mit Sicherheit gesagt werden, dass die zwei Superkomplexe aus den gleichen Atmungskettenkomplexen aufgebaut sind, da ihre Bandenmuster identisch sind (auch nach einer Silber-Färbung des Gels werden keine zusätzlichen Subkomplexe in S1 oder S2 angefärbt). Um genaueren Aufschluss über die Zusammensetzung der Superkomplexe zu erhalten, werden sie in einer zweiten, SDS-haltigen Gel-Dimension untersucht, die Superkomplexe in ihre einzelnen Proteinuntereinheiten auftrennen soll.

#### 5.2.4 Zweidimensionale Gelanalyse mit 2D BN/SDS Gelen

Ein Streifen eines blau-nativen Gels mit dem Digitoninsolubilisat aus *Chlamydomonas*-Mitochondrien wird für eine zweite, SDS-haltige Gel-Dimension verwendet. Um eine gute Auftrennung im Massenbereich der Superkomplexe zu erreichen, wird in der ersten Gel-Dimension der Totalacrylamid-Gradient auf 3% bis 8% eingestellt. Durch die Inkubation des Gelstreifens mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS denaturieren die Proteinkomplexe und –superkomplexe. Während der Elektrophorese werden ihre Proteinuntereinheiten der apparenten Molmasse nach aufgetrennt. Das Gel wird nach der Elektrophorese mit Silber gefärbt (siehe Abbildung 5.14).

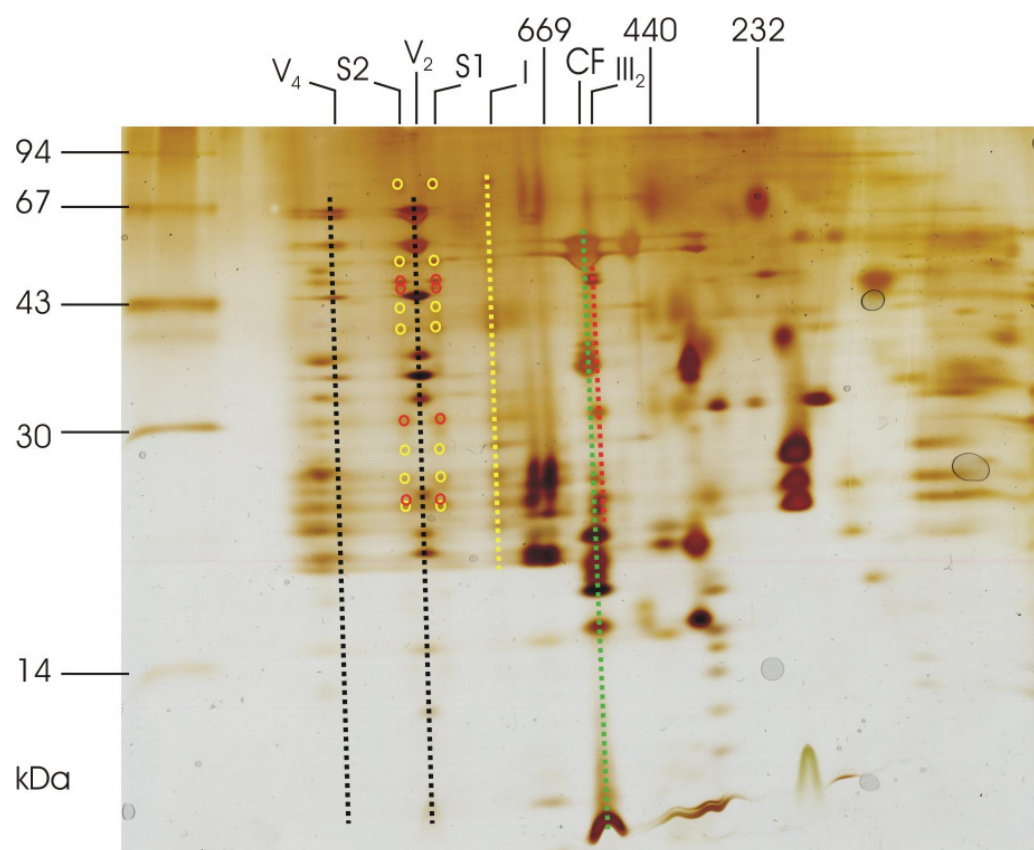
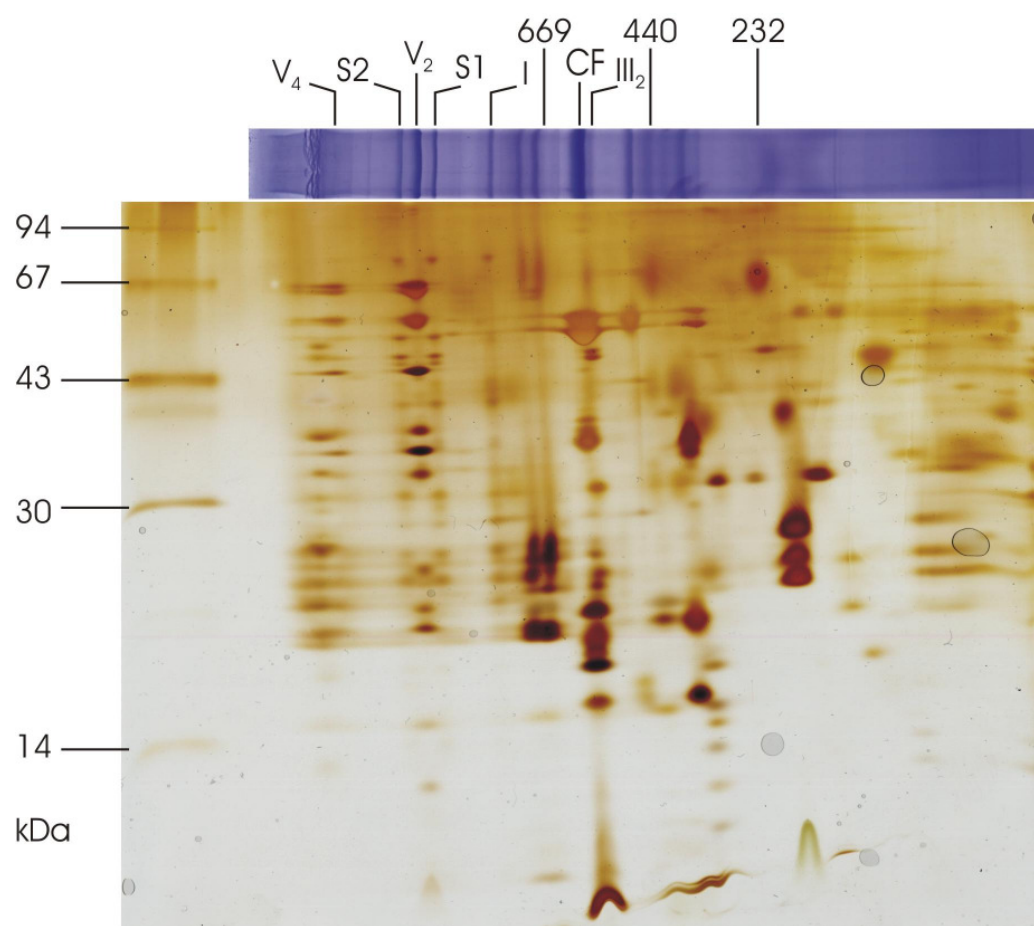
Die Laufrichtung der ersten Gel-Dimension ist von links nach rechts, die der zweiten von oben nach unten. Das bedeutet, die Atmungskettensuperkomplexe mit hoher Molekularmasse befinden sich auf der linken Seite des Gels. Ihre Untereinheiten

---

werden vertikal untereinander getrennt, diejenigen mit der größeren apparenten Molmasse befinden sich weiter oben im Gel. Man erkennt die Untereinheiten des Tetramers der mitochondrialen ATP-Synthase ( $V_4$ ) auf der linken Seite des Gels, die Untereinheiten des Dimers ( $V_2$ ) liegen etwas weiter rechts. Vor einer eindeutigen Identifikation durch eine massenspektrometrische Analyse erkennt man diese Superkomplexe erstens an ihrer Lage: Sie befinden sich genau unterhalb derjenigen Banden im Gel der ersten Dimension, die im Aktivitätstest für Komplex V eine Färbung gezeigt hatten. Zweitens besitzen die beiden Superkomplexe S1 und S2 eine identische und für die mitochondriale ATP-Synthase dieses Organismus bekannte Zusammensetzung von Untereinheiten, und sind somit eindeutig zu erkennen. Ein Monomer der mitochondrialen ATP Synthase ist im Gel nicht zu sehen. Er wäre sonst bei etwa 750 kDa der ersten Dimension zu finden gewesen, aber das doch sehr deutlich und gut erkennbare Bandenmuster wiederholt sich in diesem Bereich nicht noch einmal.

Die am weitesten links liegenden Proteinuntereinheiten stammen aus einem Aggregat, das schon in der ersten Gel-Dimension sichtbar ist (im blau-nativen Gelstreifen in Abbildung 5.14) und sich aus verschiedenen Komplexen zusammensetzt. Zwei Reihen mit Untereinheiten der Superkomplexe S1 und S2 sind links und rechts der Untereinheiten von Komplex  $V_2$  zu finden. Obwohl die Identität der Untereinheiten noch nicht geklärt sind, lässt sich doch mit Sicherheit sagen, dass diese Superkomplexe keine ATP-Synthase beinhalten, denn die Muster der Untereinheiten stimmen zwischen Komplex  $V_2$  einerseits und S1/S2 andererseits nicht überein. Des Weiteren zeigt sich, dass S1 und S2 eine ähnliche Zusammensetzung haben. Sie scheinen beide Untereinheiten sowohl des Komplexes I, als auch von Komplex III zu enthalten, da sie deutliche Übereinstimmungen mit den Mustern von Untereinheiten der individuellen Komplexe I und  $III_2$  zeigen.







---

**Abbildung 5.14: Zweidimensionale Gelelektrophorese von angereicherten Mitochondrien aus *Chlamydomonas reinhardtii*.** Erste Gel-Dimension 3 % - 8 % Totalacrylamid, zweite Dimension 13%. In (a) und (b) ist das gleiche Gel abgebildet, einmal mit, einmal ohne Markierung der Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, III und V. Auf der linken Seite der Abbildungen sind vertikal angeordnet die Untereinheiten der Superkomplexe S1 und S2 zu sehen, in der Mitte dazwischen die Untereinheiten des Dimers der mitochondrialen ATP-Synthase. Weiter rechts folgen Komplex I, dann die Chloroplasten-ATP-Synthase und das Dimer von Komplex III. Man erkennt deutlich, dass die Superkomplexe S1 und S2 sowohl Untereinheiten von Komplex I, als auch von Komplex III enthalten. Links des Superkomplexes V<sub>4</sub> befinden sich die Untereinheiten eines Aggregats, das sich aufgrund der hohen Proteinmenge in der ersten Gel-Dimension gebildet hat. Markierungen für Komplex I sind gelb, Komplex III rot, Komplex V schwarz und Chloroplasten-ATP-Synthase (CF) grün.

Die Komplexe I und III<sub>2</sub> wiederum wurden, wie schon Komplex V, anhand der Lage der positiven Aktivitätstests und ihrer apparenten Molmasse in der ersten Gel-Dimension und ihres Musters von Proteinuntereinheiten im 2D-Gel zugeordnet. In Abbildung 5.14 sind die Proteinuntereinheiten, und die individuellen Komplexe, denen sie vermutlich entsprechen, im unteren Bild farblich gekennzeichnet. Zusätzlich zu den mitochondrialen Atmungskettenkomplexen ist das Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase zur besseren Unterscheidung von der mitochondrialen ATP-Synthase markiert (Komplex V schwarz, I gelb, III rot und die Chloroplasten-ATP-Synthase grün).

Im Gel nicht zu sehen ist der in der Antikörpermarkierung aufgetretene Komplex III<sub>x</sub>, so dass bezweifelt werden muss, dass es sich bei dem im Antikörpertest an dieser Stelle markierten Proteinkomplex wirklich um Komplex III handelt. Wahrscheinlicher ist, dass ein anderes Protein/ein anderer Proteinkomplex vom Antikörper falsch positiv markiert wurde.

Im Aktivitätstest, sowie in der blau-nativen ersten Gel-Dimension, sind weitere Banden im hohen Massenbereich sichtbar (bezeichnet mit S3 und S4 in Abbildung 5.12). Für diese – sehr schwachen - Banden finden sich keine entsprechenden Proteinuntereinheiten nach der 2D-PAGE. Ihre Untereinheiten hätten sich ansonsten etwa im Bereich zwischen V<sub>4</sub> und S2 befunden, vermutlich ist jedoch dafür die Proteinmenge zu gering gewesen, um eine sichtbare Anfärbung zu ermöglichen.

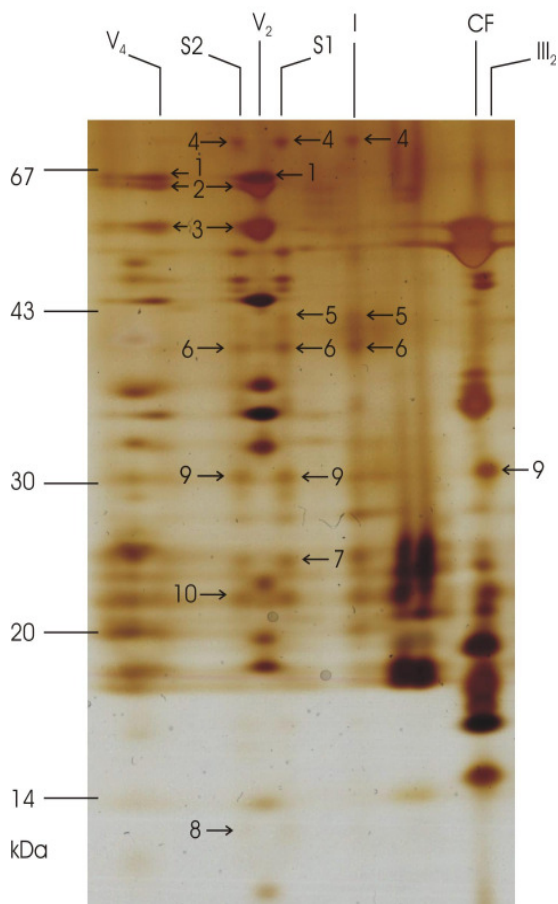
Da bis hierher die Übereinstimmungen zwischen Untereinheiten der Superkomplexe und der individuellen Komplexe aus der zweidimensionalen Gelanalyse rein optisch

---

festgestellt werden, und die Zuordnung aufgrund von Aktivitätstests und Antikörpernachweisen gemacht wird, muss zur weiteren Verifizierung der Identität der Proteinuntereinheiten eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt werden. So kann die Identität der Proteinuntereinheiten zweifelsfrei bestimmt werden.

### 5.2.5 Massenspektrometrische Analyse

Um die Zusammensetzung der Superkomplexe S1 und S2 aus den individuellen Atmungskettenkomplexen zu belegen, ist es notwendig gemeinsame Untereinheiten für beide eindeutig zu identifizieren. Des Weiteren soll gezeigt werden, dass die als V<sub>2</sub> und V<sub>4</sub> bezeichneten Komplexe tatsächlich die mitochondriale ATP-Synthase sind. Zu diesem Zweck werden die entsprechenden Spots aus 2D Gelen verschiedener Mitochondrienpräparationen ausgestochen und die Proteine mit Trypsin verdaut. Eine MALDI-PMF Analyse ergibt die in Abbildung 5.15 und Tabelle 5.5 zusammengefassten Daten. Hierbei gelingt die Identifikation nicht für alle gezeigten Proteine in allen Gelen, es werden jedoch nur solche in Abbildung 5.15 und Tabelle 5.5 gezeigt, die reproduzierbar aufgetreten sind. Auf diese Weise wird die Gefahr einer falsch positiven Identifikation verringert.



**Abbildung 5.15:** Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe und -superkomplexe aus *Chlamydomonas reinhardtii*, aufgetrennt in einer zweidimensionalen BN/SDS PAGE.

Die durch PMF identifizierte Untereinheiten sind markiert. Die Proteine Nummer 1 bis 3 sind Bestandteile von Komplex V, 4 bis 8 stammen aus Komplex I, und 9 und 10 konnten Komplex III zugeordnet werden. Die Namen bzw. Nummern der Untereinheiten, ihre Zugehörigkeiten zu den Atmungskettenkomplexen und kalkulierten Molekularmassen sowie die Identifikationsnummern der NCBI Datenbank sind in Tabelle 5.5 aufgeführt.

Abbildung 5.15 zeigt den Ausschnitt aus einem 2D BN/SD Gel, in dem die durch PMF identifizierte Proteine markiert sind. Die weiteren Informationen zu den identifizierten Untereinheiten sind in der Tabelle 5.5 aufgeführt.

Die Identität von Dimer ( $V_2$ ) und Tetramer ( $V_4$ ) der mitochondrialen ATP-Synthase wird anhand der Identifikation dreier verschiedener Untereinheiten in beiden Superkomplexen eindeutig belegt (Nummer 1-3 in Abbildung 5.15). Hier zeigt sich auch, wie in Tabelle 5.5 bereits erwähnt, dass die kalkulierten Massen aus der Datenbank nicht den apparenten Massen im Polyacrylamidgel entsprechen, obwohl die Identität der Untereinheiten aufgrund der hervorragenden Reproduzierbarkeit und hoher Bewertungszahlen (sie liegen über 100 bis teilweise 200, bei signifikanten Ergebnissen ab einer Bewertungszahl von 61) der Identifikation nicht angezweifelt werden kann.

**Tabelle 5.5: Aus mitochondrialen Superkomplexen mittels PMF identifizierte Proteinuntereinheiten.** Die Proteine wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt wie in Abbildung 5.14 und .15 gezeigt und aus den Gelen ausgestochen.

Nummer	in	Bestandteil	von	Kalkulierte Molekularmasse	Identifikationsnummer
Abbildung 5.15		Atmungskettenkomplex		laut Datenbank *	
1		V, assoziiertes Protein		62995 Da	gi 29786351
		P60, ASA1			
2		V, $\beta$ -Untereinheit		61783 Da	gi 18123
3		V, $\alpha$ -Untereinheit		61476 Da	gi 1495363
4		I, 78 kDa Untereinheit		79282 Da	gi 34485506
5		I, 49 kDa Untereinheit		52605 Da	gi 34328792
6		I, 39 kDa Untereinheit		43627 Da	gi 33943527
7		I, 23 kDa Untereinheit		23367 Da	gi 45357080
8		I, 13 kDa Untereinheit		16156 Da	gi 44888965
9		III, Cytochrom c1		33834 Da	gi 12005507
(10)		III, Rieske-Protein		28435 Da	gi 1418674

\* Die kalkulierten Massen der Datenbank beziehen sich häufig auf ein unprozessiertes Protein (Precursor). Werden posttranslationale Modifikationen nicht berücksichtigt, kann es daher dazu kommen, dass die kalkulierte Masse der Datenbank von der tatsächlichen Masse entweder nach unten oder nach oben abweicht. Nummer 10 konnte nur einmal identifiziert werden.

Es wird ebenfalls eindeutig belegt, dass Komplex I Bestandteil der Superkomplexe S1 und S2 ist. Zwei Untereinheiten von Komplex I, die 78 kDa- und die 39 kDa-Untereinheit (Nummer 4 und 6 in Abbildung 5.15) konnten an drei Positionen im Gel, nämlich in den Untereinheiten vom vermuteten Komplex I, sowie bei den Superkomplexen S1 und S2 nachgewiesen werden. Die 49 kDa-Untereinheit (Nummer 5) kann für Komplex I und Superkomplex S1 sicher identifiziert werden, die 23 kDa-Untereinheit (Nummer 7) für den Superkomplex S1. In Superkomplex S2 findet sich außerdem die 13 kDa-Untereinheit (Nummer 8), wobei die Bewertungszahl in diesem Fall an sich zu niedrig ist, um das Ergebnis als signifikant zu bezeichnen. Jedoch passt die Position im Gel sehr gut zur errechneten Masse des Proteins. Außerdem ist die Bewertungszahl bei Identifikationen von kleinen Proteinen für gewöhnlich niedrig, vermutlich aufgrund der Tatsache, dass kleinere Proteine durch die Proteasespaltung in nur wenige zur Identifikation benötigte Peptide geschnitten werden.

---

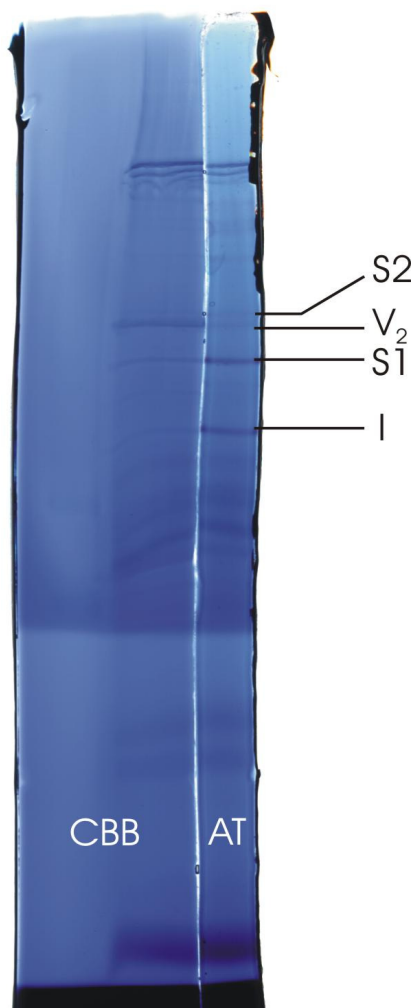
Das zu Komplex III gehörende Cytochrom c1 (Nummer 9) wird an drei Positionen identifiziert, nämlich in den Superkomplexen S1 und S2, sowie an der Position im 2D Gel, an der aufgrund des Antikörpernachweises und der apparenten Molekularmasse der Komplex III<sub>2</sub> vermutet wird. Als eine weitere Untereinheit von Komplex III wird das Rieske-Eisen/Schwefel-Protein in Superkomplex 2 identifiziert (Nummer 10). In Abbildung 5.14 sind zwei weitere Untereinheiten der Superkomplexe S1 und S2 markiert, die dem Anschein nach zu Komplex III gehören (rot umkreist, bei 45 bis 50 kDa im unteren Bild). Diese Untereinheiten konnten nicht identifiziert werden. Hier ergibt der Datenbankabgleich jeweils einen Treffer für Proteinuntereinheiten der ATP-Synthase, die in räumlicher Nähe liegen.

### 5.2.6 Isolierung des Superkomplexes S1 für die Elektronenmikroskopie

Die Zusammensetzung der Superkomplexe S1 (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) und S2 (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>), die beide jeweils die Atmungskettenkomplexe I, III und IV enthalten, kann mit den beschriebenen biochemischen Methoden (siehe Kapitel 4.8-9, 4.11, 4.15) geklärt werden. Um aber ihre Funktion zu verstehen, ist es wichtig, auch ihre Struktur zu kennen. Es soll festgestellt werden, ob sich eine reine Probe von intakten Superkomplexen isolieren lässt, um eine elektronenmikroskopischen Untersuchung durchzuführen. In den vorangegangenen Untersuchungen (siehe Kapitel 5.2.1 und 5.2.3) hat sich gezeigt, dass der Superkomplex S1 in größerer Menge vorkommt als S2. In den durchgeführten *Chlamydomonas* Präparationen ist es ebenfalls immer der Superkomplex S1, der in Aktivitätstests für Komplex I das stärkere Signal zeigt. Das bedeutet nicht, dass er eine höhere spezifische Aktivität besitzt, aber es zeigt, werden die Bandenstärken von Coomassie-Blue Färbungen mit den Aktivitätstests verglichen, dass die Aktivität von S1 zumindest nicht geringer ist als von S2. Aus diesem Grund wird für die folgenden Versuche zur Gewinnung des Superkomplexes für die Elektronenmikroskopie der S1 Superkomplex gewählt. Analog wird die gleiche Präparation zur Isolierung von individuellem Komplex I durchgeführt, da Kenntnis über seine Struktur zur Interpretation der Struktur des Superkomplexes wichtig ist. Zur Gewinnung des Superkomplexes werden Mitochondrien aus photomixotroph angezüchteten *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen präpariert und ohne sie einzufrieren

---

oder zu lagern in 1,5% oder 1,0% (w/v) Digitoninlösung solubilisiert, das entspricht einem Protein/Detergens-Verhältnis von jeweils etwa 1:5,4 und 1:3,6 (m/m). Ein großes präparatives BN-Gel mit einem Totalacrylamidgradienten von 3,5% bis 13% wird vorbereitet. Das Solubilisat wird auf dieses BN-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wird ein Streifen an der Seite des Gels abgeschnitten und einem Test auf NADH-Dehydrogenase-Aktivität von Komplex I unterzogen (Abbildung 5.16). Dieser Aktivitätstest hat zwei unterschiedliche Funktionen. Erstens zeigt er die Lage der Superkomplexe S1 und S2, denn sie enthalten Komplex I, sowie den individuellen Komplex I. Zweitens könnte der Aktivitätstest anzeigen, falls während Präparation oder Gelelektrophorese die Komplexe in irgendeiner Weise geschädigt wurden, dass die NADH-Dehydrogenase-Funktion des Komplex I nicht mehr intakt ist. Aus dem Aktivitätstest kann zwar nicht abgeleitet werden, dass der Superkomplex S1 völlig unbeschädigt vorliegt; jedoch ist eine gut fokussierte und deutlich gefärbte Proteinbande im präparativen Gel nach dem Aktivitätstest eine Voraussetzung dafür, dass die Probe für die weiteren Untersuchungen geeignet ist. Färbt sich die Bande im Aktivitätstest nur schwach, ist das ein Hinweis auf eine Schädigung der Funktion und der Integrität von Komplex I, oder auch III<sub>2</sub> oder IV, da diese Komplexe den Komplex I in seiner Funktion unterstützen (Schäfer, 2006). Eine diffuse, nicht fokussierte Bande weist auf den Verlust von Untereinheiten hin.



**Abbildung 5.16: Aktivitätstest auf NADH-Dehydrogenase-Aktivität von Komplex einer präparativen BN-PAGE.** Die Färbung durch den Aktivitätstest - zu sehen im Gelstreifen rechts - zeigt sich an den Positionen der Superkomplexe S1 und S2 sowie des individuellen Komplexes I. Die Färbung befindet sich an der Oberfläche des Gels, das eine Dicke von 3 mm hat und noch durch das im Gellauf verwendete Coomassie blau gefärbt ist. Daher hebt sich die Färbung des Aktivitätstests nicht gut vom Hintergrund ab. Links gezeigt ist zum Vergleich der Rand des nicht nachgefärbten präparativen Gels. Das Gel hat einen Totalacrylamidgradienten von 3,5% bis 13%.

AT – Aktivitätstest Komplex I,

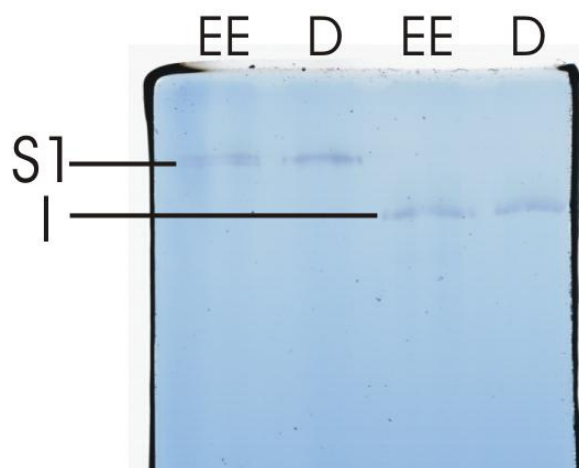
CBB – Coomassiefärbung (G-250) nach dem Gellauf, keine Nachfärbung.

Die durch den Aktivitätstest gefärbte Spur wird neben dem Gel positioniert, und die dem Superkomplex 1 und Komplex I entsprechenden Gelbanden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Da die Proteinbanden in den Randbereichen keine horizontalen Linien mehr bilden (siehe Abbildung 1.16), wird der übriggebliebene Rand des Gels vorher entfernt. Die ausgeschnittenen Proteinbanden werden zerkleinert und anschließend entweder für eine Elektroelution oder zur Elution durch Diffusion verwendet.

Beide Methoden - Elektroelution und Diffusionselution - sollen eine Gewinnung der Superkomplexe aus dem Gel ermöglichen, hierzu werden in beiden Methoden verschiedene Parameter variiert. So enthält der bei der Elektroelution verwendete Puffer in einigen Ansätzen kein Detergens, in anderen bis zu 1% (w/v) Digitonin. Die Elektroelution wird mit einer Spannung von 75 V und einer Stromstärke von maximal 4 A über einen Zeitraum von 4 Stunden durchgeführt. Während dieser Zeit wandert der negativ geladene Farbstoff Coomassie G-250 und die vom Coomassie bedeckten

Proteinkomplexe in die der Anode zugewandte Elutionskammer (siehe Abbildung 4.10). Diese blau-gefärbte Suspension wird abgesaugt und für die Elektronenmikroskopie verwendet. In einigen Ansätzen wird diese Probe sofort nach dem Absaugen mit 5% Glycerin versetzt, um möglicherweise die Stabilität des (Super-)Komplexes zu verbessern. Ein Aufkonzentrieren der Probe ist zwar zur elektronenmikroskopischen Analyse durchaus sinnvoll und üblich, trotzdem wird in diesen Experimenten darauf verzichtet, da zunächst geprüft werden soll, ob sich intakte, nicht-aggregierte Komplexe aus der *Chlamydomonas reinhardtii* Probe isolieren lassen.

Ehe eine Probe für die Elektronenmikroskopie verwendet wird, werden 2 bis 3  $\mu\text{L}$  auf ein Mini-BN-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese erfolgt eine Färbung mit Coomassie (siehe Abbildung 5.17). Ist der Komplex zu diesem Zeitpunkt bereits zerfallen oder aggregiert, zeigt sich das auf dem Gel.



**Abbildung 5.17:** Komplex I und Superkomplex S1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* nach Diffusionselektion (D) oder Elektroelution (EE) aus einer präparativen BN-PAGE. Die Proteinmenge ist nach Elektroelution und Diffusionselektion etwa gleich. Eine Doppelbande in der Spur des elektroeluierten S1 zeigt einen teilweisen Zerfall des Superkomplexes. Komplex I dagegen ist bei beiden Methoden stabil geblieben. Das Mini-BN-Gel hat einen Totalacrylamidgradienten von 3,5% bis 13%.

Auf Abbildung 5.17 sind Proben von Superkomplex S1 und Komplex I nach der Elektroelution bzw. nach Elution durch Diffusion zu sehen, aufgetrennt durch ein Mini-BN-Gel. In der Spur von S1 aus der Elektroelution (EE) ist eine Doppelbande zu erkennen. Das bedeutet, Superkomplexe mit zwei unterschiedlichen apparenten Molmassen sind in der Probe vorhanden. Hierfür gibt es zwei mögliche Gründe. Einer ist, dass während des Ausstechens der Proteinbande von Superkomplex S1 versehentlich eine weitere Proteinbande mitgenommen wurde, die die Probe



---

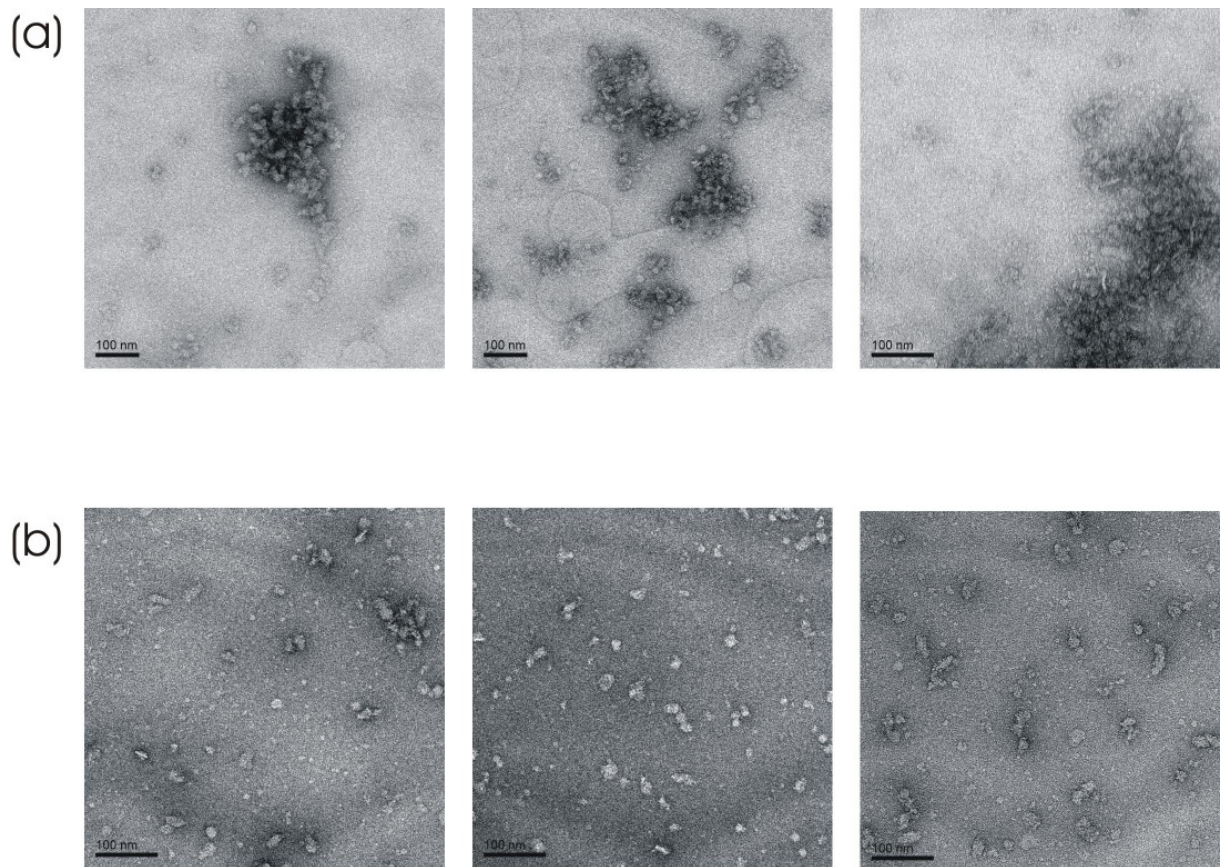
verunreinigt. Das kann allerdings ausgeschlossen werden, denn erstens zeigt die S1 Probe aus der Diffusionselution, die aus dem gleichen präparativen BN-Gel stammt, keine Doppelbande, und zweitens werden beide Teile der Doppelbande in einem Aktivitätstest auf NADH-Dehydrogenase lila angefärbt (nicht gezeigt). Es kann sich also nicht um z.B. die ATP-Synthase handeln, deren Dimerbande im BN-Gel sehr nah an Superkomplex S1 liegt. Der andere und wahrscheinliche Grund für die Doppelbande ist, dass ein Teil der S1 Superkomplexe während des Prozesses der Elektroelution einige Proteinuntereinheiten verloren haben. Dies muss nicht zwangsläufig einen Test auf NADH-Dehydrogenase-Aktivität beeinflussen, da diese Reaktion nur von einem Teil des Komplexes I, nicht aber von III<sub>2</sub> oder IV katalysiert wird. Da für die elektronenmikroskopische Untersuchung mit dem Ziel einer Strukturaufklärung ausschließlich vollständige Superkomplexe nötig sind, wird von einer Verwendung dieser Elektroelutionsprobe abgesehen.

Der Ansatz, die Proteinkomplexe durch Diffusion aus dem Gel zu lösen, beginnt mit der gleichen präparativen BN-PAGE wie der Elektroelutionsansatz. Wenn durch den Aktivitätstest die entsprechenden Banden von Superkomplex S1 und Komplex I identifiziert sind, werden sie ausgestochen, und jeweils etwa 1 cm der Bande gründlich zerkleinert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Das Zerkleinern soll eine Vergrößerung der Geloberfläche zu bewirken. Die Gelstückchen werden mit 600 µL Wasser bedeckt, dem je nach Ansatz unterschiedliche Konzentrationen an Digitonin und Glycerin zugesetzt werden. Die Ansätze werden anschließen für Zeiten von 6 bis 14 Stunden bei 4° C geschüttelt. Dann werden die Gelreste abfiltriert und es werden, wie nach der Elektroelution und wie in Abbildung 5.17 gezeigt, 2-3 µL der Probe auf ein Mini-BN-Gel aufgetragen um vor der Elektronenmikroskopie auszuschließen, dass der Superkomplex bzw. Komplex zerfallen ist.

Das Elektronenmikroskop zeigt, dass sich in allen Proben von Superkomplex S1, die durch die Elektroelution gewonnen wurden, Aggregate gebildet haben, unabhängig davon, ob Glycerin oder das Detergens Digitonin zugesetzt wurden.

Alle Bilder der Proben von Komplex I zeigten zwar einen recht hohen Gehalt an Protein, jedoch kann hier nicht die typische Form des Komplexes I erkannt werden

(siehe Abbildung 5.18 vgl. Kapitel 2.4). Desweiteren sind viele Proteinaggregate zu erkennen. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass andere Proteinkomplexe mit einer im BN-Gel sehr ähnlichen apparenten Molmasse die Probe verunreinigen, oder dass Superkomplex S1 und Komplex I während der Präparation der Probe für die Elektronenmikroskopie mit Kontrastierungsmittel (Uranylacetat) zerfallen und/oder aggregieren. So würde sich das sehr heterogene Bild erklären, das im Elektronenmikroskop zu sehen ist.

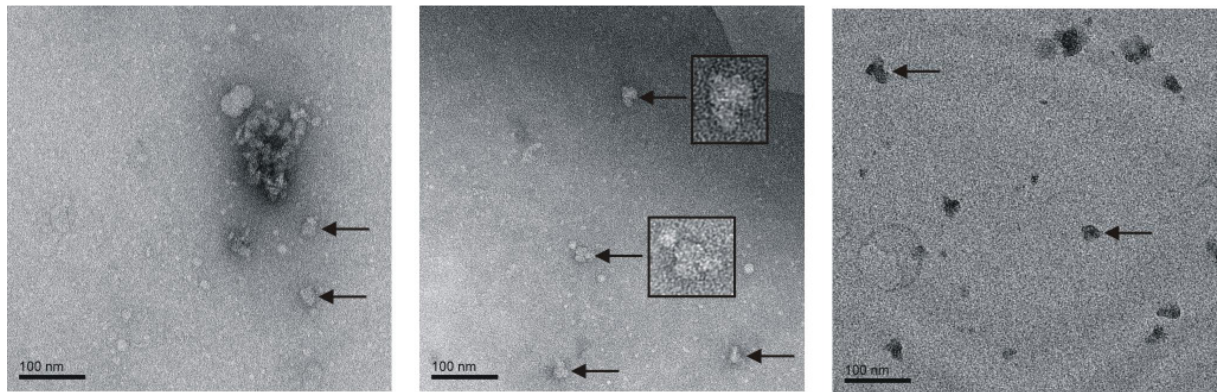


**Abbildung 5.18:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (a) Superkomplex S1 und (b) dem Atmungskettenkomplex I aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Alle Proben werden durch Elektroelution gewonnen. Keine der Proben eignet sich für eine Einzelpartikelanalyse, da die Proteine im Fall von (a) stark aggregiert vorliegen und im Fall von (b) keine typischen, L-förmigen, wiederkehrenden Partikelformen erkennbar sind. Als Kontrastierungsmittel wurde Uranylacetat verwendet. Der schwarze Balken in den Bildern entspricht 100 nm.

Die Elution durch Diffusion erbrachte im Fall von Superkomplex S1 bessere Ergebnisse als die Elektroelution. Wie in dem Beispiel in Abbildung 5.17 gezeigt, übersteht der Superkomplex die Elution durch Diffusion ohne dass sich im Kontroll-

---

BN-Gel eine Doppelbande zeigt. Unter dem Elektronenmikroskop zeigen sich dann jedoch wieder verstärkt Probleme mit Aggregaten, die einen großen Teil der Gesamtproteinmenge, die dort zu sehen ist, betreffen. Allerdings können neben den Aggregaten auch wiederkehrende Formen erkannt werden, die vermutlich Superkomplex S1 darstellen (siehe Abbildung 1.19).



**Abbildung 5.19:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Superkomplex S1 aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Pfeile markieren die vermutlichen Superkomplexe S1. Zwei von ihnen wurden vergrößert dargestellt. Die Probe wird aus einem präparativen BN-Gel in Wasser mit 1% Digitonin 14 Stunden lang herausgelöst. Eine Zugabe von Glycerin erfolgte nicht.

Für eine strukturelle Einzelpartikel-Analyse von Superkomplex S1 reicht die Qualität dieser Probe nicht aus. Eine weitere Optimierung der Gewinnung des Komplexes, und möglicherweise die Wahl einer anderen Art der Negativ-Kontrastierung, könnten hier zu einem positiven Ergebnis führen.

### 5.2.7 Diskussion

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt mindestens zwei Atmungskettensuperkomplexe, die aus den individuellen Komplexen I, III<sub>2</sub> und IV<sub>1-2</sub> zusammengesetzt sind und in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben werden. Im blau-nativen Gel sind die Superkomplexe knapp ober- und unterhalb des Dimers der mitochondrialen ATP-Synthase angeordnet. Dieses Dimer besitzt eine apparente Molmasse von etwa 1,6 Megadalton (van Lis et al., 2003, eigene Daten).

Aktivitätstests auf Komplex I und IV zeigen eine Beteiligung dieser Komplexe als Bestandteil beider Superkomplexe S1 und S2. Ein Antikörpertest weist auf eine

---

Beteiligung von Komplex III hin. Das Bandenmuster der Komplexe I und III, welches diese bei Auftragung auf ein 2D-SDS Gel ergeben, findet sich in den Superkomplexen S1 und S2 wieder. Bestätigt wird weiterhin die Beteiligung der Komplexe I und III an beiden Superkomplexen durch die Identifikation von mehreren Untereinheiten der beiden Komplexe mittels MALDI-Massenspektrometrie und PMF.

Komplex III liegt in seiner aktiven Form als Dimer vor (Saraste et al., 1981), der in *Chlamydomonas reinhardtii* etwa eine apparente Molmasse von 500 kDa hat (van Lis et al., 2003, eigene Daten). Davon ausgehend, dass der kleinere Superkomplex S1 ein solches funktionelles Dimer III<sub>2</sub>, sowie mindestens einen Komplex I (800 kDa) und einen Komplex IV (240 kDa, beide Massen nach van Lis et al., 2003) enthält, ergibt sich für S1 eine berechnete apparente Molmasse von etwa 1540 kDa. Die entsprechende Bande sollte also dicht unterhalb der Bande des mitochondrialen ATP-Synthase-Dimers mit 1,6 Megadalton liegen, was auch tatsächlich der Fall ist. Es ist somit anzunehmen, dass die Stöchiometrie von Superkomplex S1 I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> ist. Damit entspricht er dem in Rind zuerst beschriebenen und aus anderen Organismen bekannten Superkomplex b (Schägger and Pfeiffer, 2000).

Superkomplex S2 besitzt eine apparente Molmasse von über 1,6 Megadalton, allerdings liegt seine Bande relativ nah über der Referenzbande des mitochondrialen ATP-Synthase-Dimers, er sollte demnach nicht viel größer sein. Addiert man zu den für S1 angenommenen 1540 kDa noch einmal 240 kDa für einen Komplex IV dazu, so erhält man 1780 kDa, was der Position der Bande von S2 gut entspricht. Die Stöchiometrie, die der Zusammensetzung von Superkomplex S2 aus den Komplexen I, III und IV und der beobachteten Masse also am besten entspricht, ist I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>. Superkomplex S2 besitzt im Vergleich zu Superkomplex S1 eine zusätzliche Kopie von Komplex IV und ist somit dem bereits beschriebenen Superkomplex c (Schägger and Pfeiffer, 2000) gleichzusetzen.

Neben Superkomplex b wird häufig auch der Superkomplex a für unterschiedlichste Organismen, wie verschiedene Tiere, Pflanzen und Pilze beschrieben (Arnold et al., 1998b; Schägger and Pfeiffer, 2000; Eubel et al., 2003; Krause et al., 2004aa; Krause et al., 2004bb; Reifschneider et al., 2006; Marques et al., 2007). Dieser Superkomplex besteht aus Komplex I und einem Dimer von Komplex III. In *Chlamydomonas reinhardtii* findet sich kein Hinweis auf einen Superkomplex dieser

---

Zusammensetzung. Dies ist einerseits überraschend, da Superkomplex a bereits in vielen anderen Grünpflanzen gefunden wurde, wie Spinat (*Spinacia oleracea*), Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Gerste (*Hordeum vulgare*) und Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*). In den betreffenden Untersuchungen wurden unter anderem auch die in dieser Arbeit verwendeten Detergenzien und Gelsysteme benutzt, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass hier ein methodischer Fehler vorliegt. Andererseits ist schon früher aufgefallen, dass *Chlamydomonas reinhardtii* im Bezug auf die Organisation seiner Atmungskettenkomplexe Besonderheiten aufweist. So ist er der bislang einzige bekannte Organismus, in dem die mitochondriale ATP-Synthase ausschließlich als stabiles Dimer vorliegt (van Lis et al., 2003). Desweiteren wurde auch das in *Chlamydomonas reinhardtii* entdeckte Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimer bislang in keinem anderen Organismus gefunden (Rexroth et al., 2004). Superkomplex a enthält Komplex I. Komplex I konnte in den in Kapitel 5.2 beschriebenen Experimenten besonders gut sowohl durch sein unverwechselbares Bandenmuster im 2D-SDS-Gel, durch Aktivitätstests als auch durch massenspektrometrische Analysen nachgewiesen werden. Es kann demnach ausgeschlossen werden, dass ein Superkomplex der Stöchiometrie  $I_1III_2$  übersehen wurde, wäre er da gewesen. Viel wahrscheinlicher ist, dass dieser in anderen Organismen häufig auftretende Superkomplex in *Chlamydomonas reinhardtii* nicht vorkommt, was eine weitere Besonderheit dieser Pflanze ausmacht.

Obwohl *Chlamydomonas reinhardtii* in unserer Arbeitsgruppe schon früher eingehend untersucht wurde, fanden sich erste Hinweise auf Atmungsketten-Superkomplexe erst, nachdem die Aufschlussmethode der Zellen von French Press auf den schonenderen Aufschluss durch das Schütteln mit Glasperlen umgestellt wurde (Schwassmann, 2004).

Anders als tierische Zellen besitzen Pflanzenzellen eine stabile Zellwand, die zerstört werden muss, ehe die Mitochondrien isoliert werden können. Der in dieser Arbeit eingesetzte Mutante cw-15 fehlen für die Stabilität wichtige Bestandteile der Zellwand. Daraus resultierend sind die Zellen nicht tröpfchenförmig, sondern rund. Die Zellen des Wildtyps lassen sich durch die schonende Methode des Schüttelns mit Glasperlen nicht aufschließen, sie erfordern harschere Methoden. Da auch Versuche,

---

die Zellwand mit Detergenzien zu hydrolysieren keine gute Ausbeute erbrachten (Daten nicht gezeigt), sind daher meiner Ansicht nach für eventuell folgende Untersuchungen Zellwand-Mutanten dem Wildtyp der Alge vorzuziehen, auch wenn hier ein geringes Risiko besteht, dass die –natürlich aufgetretene– Mutation nicht allein die Zellwand betrifft, sondern auch andere Organellen und möglicherweise sogar die Atmungskette verändert haben könnte.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Superkomplex S1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* ist prinzipiell möglich und sollte der des anderen relativ abundanten Superkomplexes S2 vorgezogen werden, da S1 stabiler ist und in größerer Menge vorliegt. Die Tatsache, dass dieser Superkomplex in Lösung eine starke Tendenz zur Aggregation zeigt, macht es jedoch notwendig, die Gewinnung des Superkomplexes und ihre Stabilisierung zu optimieren. Hierfür sind möglicherweise Lipide, z.B. Cardiolipin nützlich, die den Erhalt der nativen Struktur des Superkomplexes stabilisieren könnten. Um eine größere Anzahl an Proben zeitgleich auf ihre Eignung für die elektronenmikroskopische Untersuchung zu überprüfen, wäre auch der Einsatz von beispielsweise Dynamic Light Scattering angebracht. Mit dieser Methode können schon vor der Mikroskopie die Partikelgrößen in einer Probe bestimmt werden, so dass aggregierte Proben verworfen werden können.

Der Superkomplex b aus Rinderherz wurde bereits erfolgreich durch Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse charakterisiert (Schäfer et al., 2006; Schäfer et al., 2007). Da der Superkomplex die gleiche Zusammensetzung besitzt wie der in dieser Arbeit untersuchte pflanzliche Superkomplex S1, nämlich  $I_1III_2IV_1$ , ist erstens anzunehmen, dass die Strukturen sich ähneln, und zweitens wäre es von Vorteil, eine solche Struktur darstellen zu können, um so einen direkten Vergleich zwischen tierischem und pflanzlichem Superkomplex ziehen zu können. Die Bilder von Superkomplex S1 (siehe Abbildung 5.19) ähneln Top-Views, also Ansichten von oben auf die Membranebene, von Bildern des Superkomplexes b (Schäfer et al., 2006), so dass eine ähnliche Zusammensetzung der Komplexe zum Superkomplex b, bzw. S1 in Rind und Alge wahrscheinlich ist.

---

## 5.3 Altersabhängigkeit der Quantität von Atmungskettensuperkomplexen im *Rattus norvegicus* Gehirn

Mitochondrien, die Atmung und dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einerseits, und das Altern andererseits stehen in einem noch nicht vollständig erforschten Zusammenhang. Das Gehirn wird, als ein Organ geringer Regenerativität (French-Constant and Mathews, 1994), durch das Altern und altersbedingte Krankheiten stark in seiner Funktion beeinträchtigt. Gleichzeitig ist es respiratorisch außerordentlich aktiv. Es verbraucht im menschlichen Organismus etwa 20% des Sauerstoffs und etwa 50% der Glucose, macht dabei jedoch nur 2% der Gesamtmasse des Körpers aus (Pellerin et al., 2002). Die altersbezogenen Veränderungen der für die Respiration zuständigen Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe zu klären, ist daher von entscheidender Wichtigkeit zum Verständnis der Alternsprozesse.

### 5.3.1 Tiere

Für die Experimente standen jeweils die linken Gehirnhälften von männlichen Fischer-Ratten unterschiedlichen Alters zur Verfügung (siehe Tabelle 5.6). Einige der Gehirne wurden bereits von N. Reifschneider präpariert (Präparationsdatum 29.06.2005) und im Rahmen ihrer Dissertation untersucht. Das Protokoll zur Präparation ist für alle Proben identisch, mit der Ausnahme, dass zu den am 1.3.2007 präparierten Proben ein Phosphatase-Inhibitor-Cocktail gegeben wurde, da an diesen Proben die Phosphorylierung verschiedener Proteine untersucht werden sollte (Schäfer, 2007).

Die von Reifschneider beschriebene Aufreinigung der Mitochondrien-Rohfraktion an einem Stufengradienten wurde nicht durchgeführt, da sie einen Proteinverlust von fast 50% mit sich gebracht hätte. Außerdem wird durch den Stufengradienten hauptsächlich Myelin abgetrennt. Myelin aber stört die hier geplante Analyse der Atmungskettensuperkomplexe nicht, da es sich aufgrund der in der ersten Dimension

viel geringeren apparenten Molmasse in der zweidimensionalen BN/SDS-PAGE an einer anderen Stelle im Gel befinden als die Superkomplexe (Reifschneider, 2006, eigene Ergebnisse).

**Tabelle 5.6: Liste der für die Experimente verwendeten Ratten.** Die Tiere wurden von der Arbeitsgruppe Goto von der Toho Universität in Funabashi, Japan gezüchtet und die fertig präparierten Gewebe zur Verfügung gestellt

Tier	Alter	Gewicht der Hirnprobe	Todesdatum	Präparation
F-498-1	5 Monate	1,01 g	08.12.2000	29.06.2005
F-498-2	5 Monate	0,98 g	08.12.2000	29.06.2005
F-498-3	5 Monate	1,04 g	08.12.2000	09.08.2006
F-542-2	17 Monate	0,74 g	08.03.2004	29.06.2005
F-542-3	17 Monate	1,18 g	08.03.2004	29.06.2005
F-543-3	17 Monate	0,92 g	08.03.2004	09.08.2006
F-544-3	17 Monate	1,01 g	08.03.2004	01.03.2007
F-444-1	31 Monate	1,11 g	10.01.2002	29.06.2005
F-444-2	31 Monate	1,12 g	10.01.2002	29.06.2005
F-445-1	31 Monate	0,90 g	10.01.2002	09.08.2006
F-445-2	31 Monate	1,05 g	10.01.2002	01.03.2007

Die Solubilisierung der Mitochondrien wird hier, wie in der Arbeit von Reifschneider, mit 8 g Digitonin pro g Protein durchgeführt. Die Ergebnisse können somit gut miteinander verglichen werden, und es wird aufgrund der relativ hohen Digitoninmenge eine quantitative Ausbeute der Atmungskettenkomplexe erreicht.

### 5.3.2 Auftrennung der Atmungskettensuperkomplexe durch 2D-BN/SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Atmungskettenkomplexe und –superkomplexe findet mittels des imidazolhaltigen Gelsystems nach Solubilisierung mit 8 g Digitonin pro g Protein und nach der in Kapitel 4.8.1 beschriebenen Methode statt. Der Gradient der BN-Gele reicht von  $T = 4\%$  bis  $13\%$ . Die Denaturierung des 1D-Gelstreifens erfolgt durch eine einstündige Inkubation in einer  $1\%$  SDS /  $1\%$   $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung. Die zweite

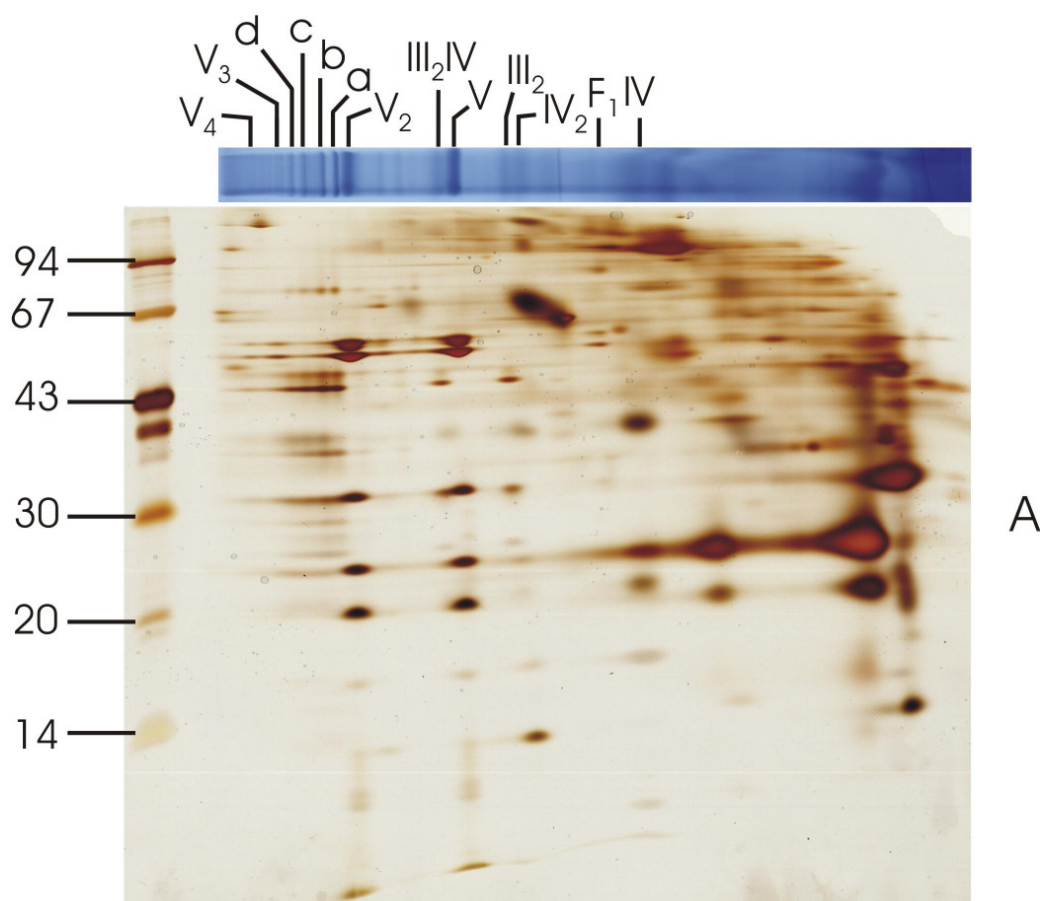


---

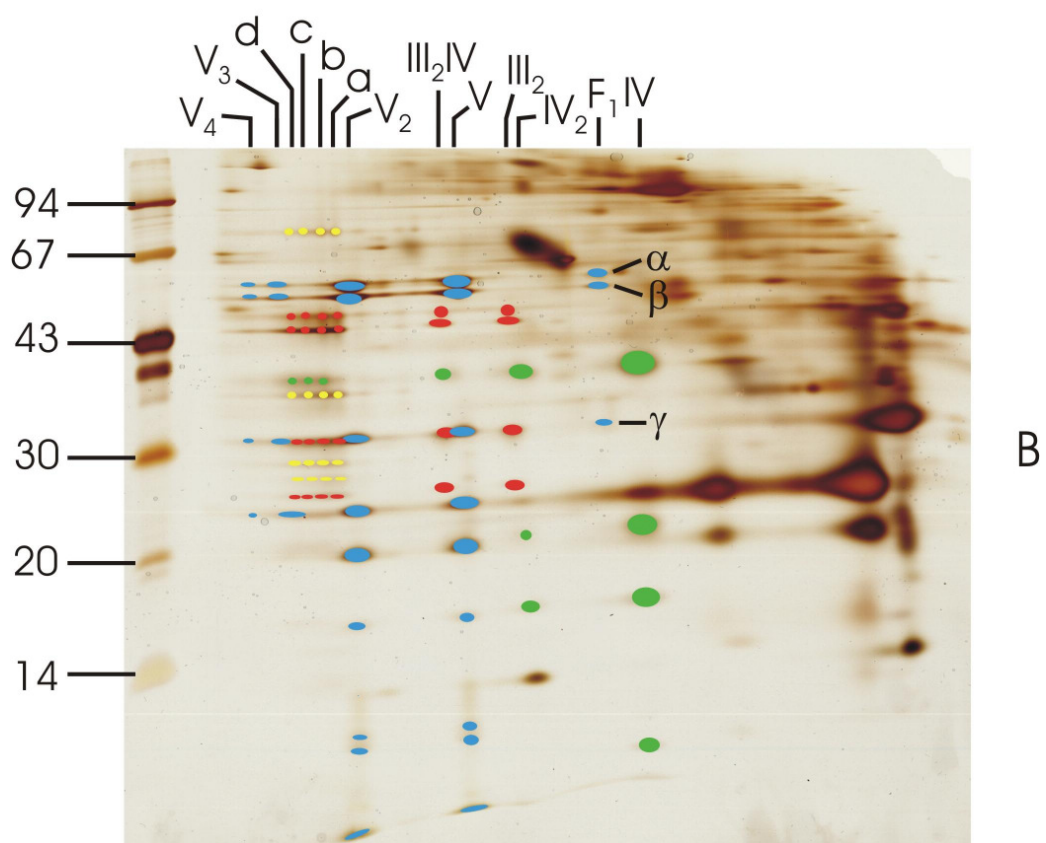
Gel-Dimension wird wie in Kapitel 4.8.2 beschrieben durchgeführt; das Trenngel des 2D-Gels hat einen Totalacrylamidgehalt von 13%.

Um eine Übersicht über die im Hirn von *Rattus norvegicus* vorkommenden Atmungskettensuperkomplexe zu geben, sind in Abbildung 5.20 die zwei Dimensionen eines BN/SDS Gels gezeigt. In der ersten, blau-nativen Gel-Dimension in Bildteil A sind die Banden der Atmungskettenkomplexe sowie ihrer Superkomplexe zu sehen. Die zweite Gel-Dimension trennt Komplexe und Superkomplexe in ihre Proteinuntereinheiten auf, die im Bildteil A gezeigt und im Bildteil B farblich markiert sind.

Bei der Betrachtung des Gels fällt zunächst die mitochondriale ATP-Synthase auf (Komplex V, in Abbildung 5.20 B blau markiert), die als Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer auftritt. Der freie Subkomplex  $F_1$  ist ebenfalls im Gel sichtbar. Obwohl die Quantität eines Proteins wegen des geringen linearen Bereichs im Silber-gefärbten Gel nicht genau bestimmt werden kann, lässt sich trotzdem folgern, dass das Monomer und das Dimer der ATP-Synthase die mit Abstand häufigsten Formen dieses Komplexes sind. In allen Stöchiometrien sind jeweils die zwischen den Markerbanden bei 67 kDa und 43 kDa laufenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, sowie die knapp über 30 kDa lokalisierte  $\gamma$ -Untereinheit deutlich zu sehen. Der geringe Anteil an Trimeren und Tetrameren des Komplexes V kann durch das während der Elektrophorese verwendete Coomassie G-250 und das mit 8 g/g relativ hohe Digitonin zu Protein Verhältnis, mit dem die Proteine aus der Membran solubilisiert werden, erklärt werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass in CN-Gelen (colourless native), die ohne die Verwendung von Coomassie G-250, und Gelen mit Proteinen aus einer Solubilisierung mit geringerem Digitonin zu Protein Verhältnis, ein viel größerer Anteil der mitochondrialen ATP-Synthase in Oligomeren gebunden vorliegt (Krause, 2006; Reifschneider, 2006). Ebenfalls bereits bekannt ist, dass in der BN-PAGE schwache Wechselwirkungen gelöst werden können (Neff and Dencher, 1999; Pfeiffer et al., 2003; Braun et al., 2007).



A



B

---

**Abbildung 5.20: Atmungskettenkomplexe und ihre Superkomplexe aus Rattenhirn, hier ein 17 Monate altes Exemplar.** Die Komplexe und Superkomplexe werden in der ersten Gel-Dimension voneinander durch eine blau-native PAGE (Laufrichtung von links nach rechts) und in der zweiten Gel-Dimension (Laufrichtung von oben nach unten) durch eine SDS PAGE in ihre Untereinheiten getrennt. Die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe sind ihrer Zugehörigkeit nach farblich markiert; Komplex I gelb, Komplex III rot, Komplex IV grün und Komplex V blau. Massenangaben in kDa, Totalacrylamidgehalt 1. Dimension 4-13%, 2.Dimension 13%.

In Abbildung 5.20 sind die Atmungskettenkomplexe und –superkomplexe einer 17 Monate alten Ratte nach 2D-BN/SDS-PAGE zu sehen: neben Trimer und Tetramer der ATP-Synthase die Superkomplexe a bis d in der ersten, blau-nativen Gel-Dimension die Banden mit der höchsten apparenten Molmasse. In der zweiten Gel-Dimension ist ihre Zusammensetzung aus den individuellen Komplexen I, III und IV in den Stöchiometrien  $I_1III_2IV_{0.3}$  zu erkennen, wobei Superkomplex a keinen Komplex IV und Superkomplex d drei Exemplare Komplex IV enthält. Die sichtbar gefärbten Komponenten der jeweiligen individuellen Komplexe sind in Abbildung 5.20 B farblich gekennzeichnet (Komplex I gelb, Komplex III rot, Komplex IV grün). Eine in Superkomplex b bis d angefärbte Untereinheit von etwa 37 kDa des Komplex IV fehlt in Superkomplex a. Soweit anhand des Silber-gefärbten Gels abgeschätzt werden kann, ist die Menge von Superkomplex b im Vergleich am höchsten, dicht gefolgt von a. Die Superkomplexe c und vor allem d sind nur in kleinen Mengen sichtbar. Der ebenfalls bekannte Superkomplex e (Schägger and Pfeiffer, 2000; Reifschneider, 2006), der vier Kopien von Komplex IV enthält, ist nicht zu sehen. Ein individueller Komplex I ist ebenfalls nicht sichtbar; wie bereits früher beschrieben, ist dieser Komplex im Rattenhirn nach Digitoninsolubilisierung vollständig in Superkomplexen gebunden (Reifschneider et al., 2006).

Die Komplexe III und IV sind als individuelle Komplexe sichtbar, bzw. Komplex III ausschließlich in seiner aktiven Form als Homodimer, sowie ein kleiner Superkomplex der Stöchiometrie  $III_2IV$  und Dimer und Monomer von Komplex IV. Die Dimere von Komplex III und IV laufen im blau-nativen Gel aufgrund ihrer ähnlichen apparenten Molmasse dicht beieinander, können aber in der zweiten Gel-Dimension anhand ihres bekannten Bandenmusters zweifelsfrei unterschieden werden. Das Bandenmuster bestätigt nochmals die Zusammensetzung der Superkomplexe a bis d und  $III_2IV$ .

---

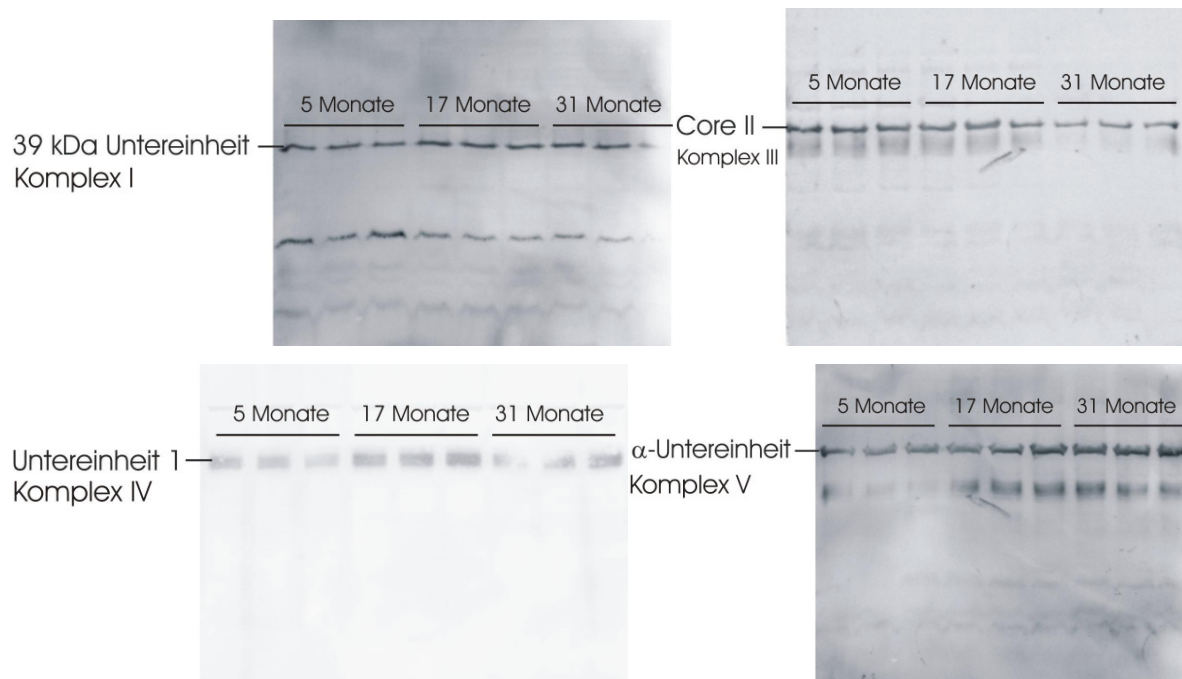
Anhand des Gelbildes kann abgeschätzt werden, dass der überwiegende Teil von Komplex III in Superkomplexen eingebaut ist, und nur ein geringer Teil frei als Homodimer (III<sub>2</sub>) vorliegt.

Komplex IV dagegen ist zum größeren Teil als individueller Komplex zu sehen, der Rest verteilt sich hauptsächlich auf die Superkomplexe b bis d und in geringerer Menge auf III<sub>2</sub>IV und IV<sub>2</sub>. Auch hier ist in Betracht zu ziehen, dass ein höherer Anteil an Komplex IV in Superkomplexe gebunden in der Membran vorliegt und durch die Solubilisierung mit 8 g/g Digitonin und die Anwesenheit von Coomassie G-250 während der Elektrophorese abgespalten wurde.

### 5.3.3 Altersbezogene Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe

Zur Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe werden drei unterschiedliche Methoden angewandt. Erstens eine densitometrische Quantifizierung nach der ersten, blau-nativen Gel-Dimension, zweitens eine Quantifizierung mit Delta2D nach Sypro<sup>®</sup> Ruby Färbung der zweiten Gel-Dimension (beide werden im Detail in der Diplomarbeit von Schäfer (Schäfer, 2007) beschrieben), und drittens eine Quantifizierung der Gesamtmenge eines Komplexes durch Westernblot eines SDS-Gels mit anschließender Antikörpermarkierung und Chemolumineszenz-Detektion. Da die ersten beiden Methoden Aufschluss darüber geben, in welcher Menge Komplexe bestimmter Stöchiometrien in einer Probe vorhanden sind, kann durch die Kombination mit der Bestimmung der Gesamtkomplexmenge ermittelt werden, ob sich die Zusammensetzung der individuellen Komplexe zu unterschiedlichen Superkomplexen, oder die absolute Menge der Komplexe ändert.

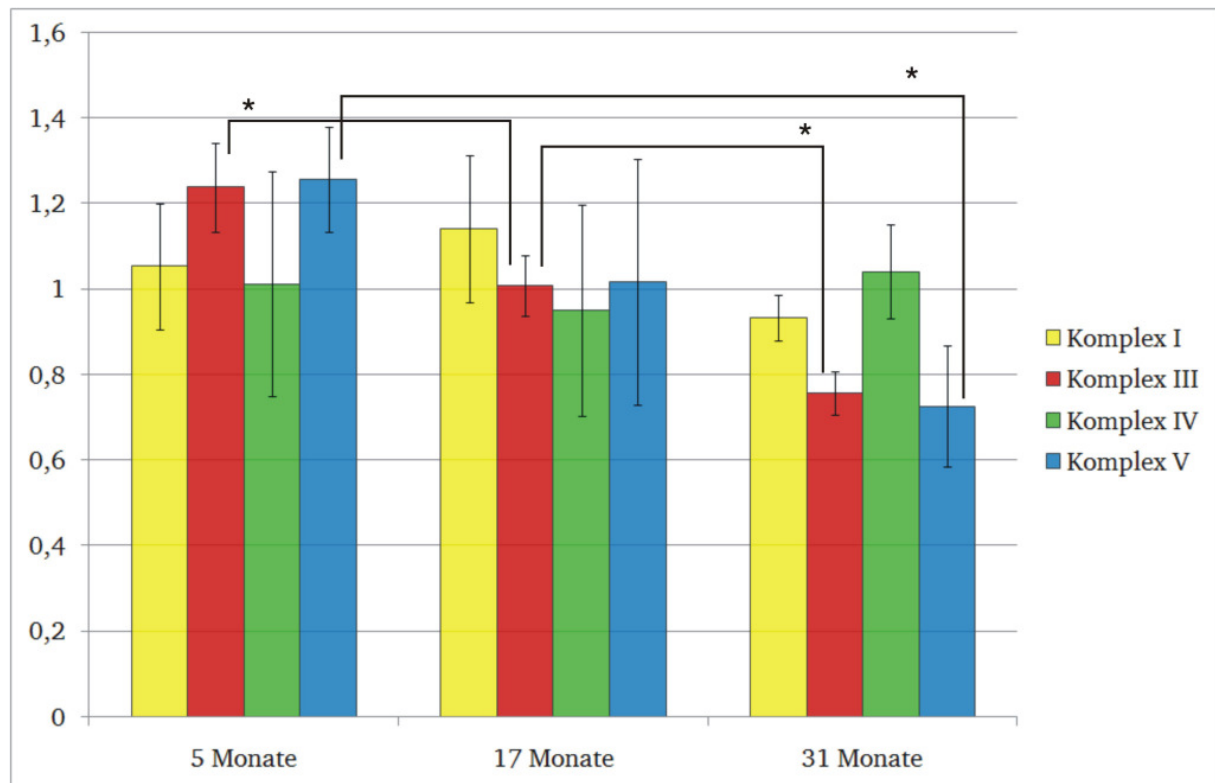
Die Gesamtmenge der Komplexe wird mit Antikörper untersucht, die jeweils gegen eine Untereinheit des gesuchten Komplexes gerichtet sind, die aus SDS-Gelen geblottet wurden; so wird eine quantitative Extraktion garantiert. Es handelt sich um die 39 kDa Untereinheit von Komplex I, das Core II Protein von Komplex III, die Untereinheit 1 von Komplex IV und um die  $\alpha$ -Untereinheit der ATP-Synthase (siehe Abbildung 5.21).



**Abbildung 5.21: Beispiele für Westernblots von Rattenhirnproben verschiedener Altersgruppen.** Markiert und quantifiziert werden die 39 kDa Untereinheit von Komplex I, das Core II Protein von Komplex III, Untereinheit 1 aus Komplex IV und die  $\alpha$ -Untereinheit der ATP-Synthase. Zur Quantifizierung werden an Stellen homogener Färbung vertikale Linien durch jede Spur gezogen, und die Gauß-Peak-Intensität berechnet. Nicht korrekt gefärbte Spuren, wie z.B. die rechte Spur der Anti-Komplex I Färbung werden nicht berücksichtigt. Die Banden werden anhand ihrer apparenten Molmasse im zu den Blots gehörenden Gelen zugeordnet.

Da in den Blots teilweise nicht alle Banden durchgehend gefärbt werden (siehe Abbildung 5.21: die Färbung der Untereinheit I von Komplex IV, oder Bande ganz rechts der 39 kDa Untereinheit von Komplex I), werden bei solchen Banden zur Quantifizierung entweder Bereiche mit einheitlicher Färbung gewählt – dies ist möglich, da nur ein vertikaler Schnitt durch die Bande und nicht deren gesamte Fläche quantifiziert wird – oder der Wert der entsprechenden Bande wird nicht mit in die Berechnung aufgenommen. Auf jedem Blot werden drei verschiedene Proben jeweils dreimal aufgetragen. Die Blots werden bis zu zweimal gestrippt und mit einem anderen Antikörper markiert. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wird die durchschnittliche Bandenintensität (Gauß-Peak-Intensity laut Ausgabe des Programms Quantity One) für jeden Blot berechnet, und dann jeder Einzelwert durch den Durchschnittswert geteilt. Auf diese Weise erhält man Werte im Bereich von 0,7 bis

1,3, die die relative Abweichung einer Probe vom Durchschnitt aller 9 Banden auf dem Blot zeigen (siehe Abbildung 5.22).



**Abbildung 5.22: Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe aus Rattenhirn verschiedener Altersgruppen.** Aufgetragen wurde die relative Menge an Gesamtkomplex in Relation zum Durchschnittsgehalt, berechnet aus der Gaußkurven-Integration eines Querschnitts der Antikörpermarkierten Blotbanden. Während der Anteil der Komplexe I und IV relativ konstant bleibt, ist ein deutlicher Abfall der Menge an Komplex III und V zu sehen. Quantifiziert wurden die Antikörpermarkierungen der in Abbildung 5.21 gezeigten Untereinheiten. \* signifikant nach Mann-Whitney-Test

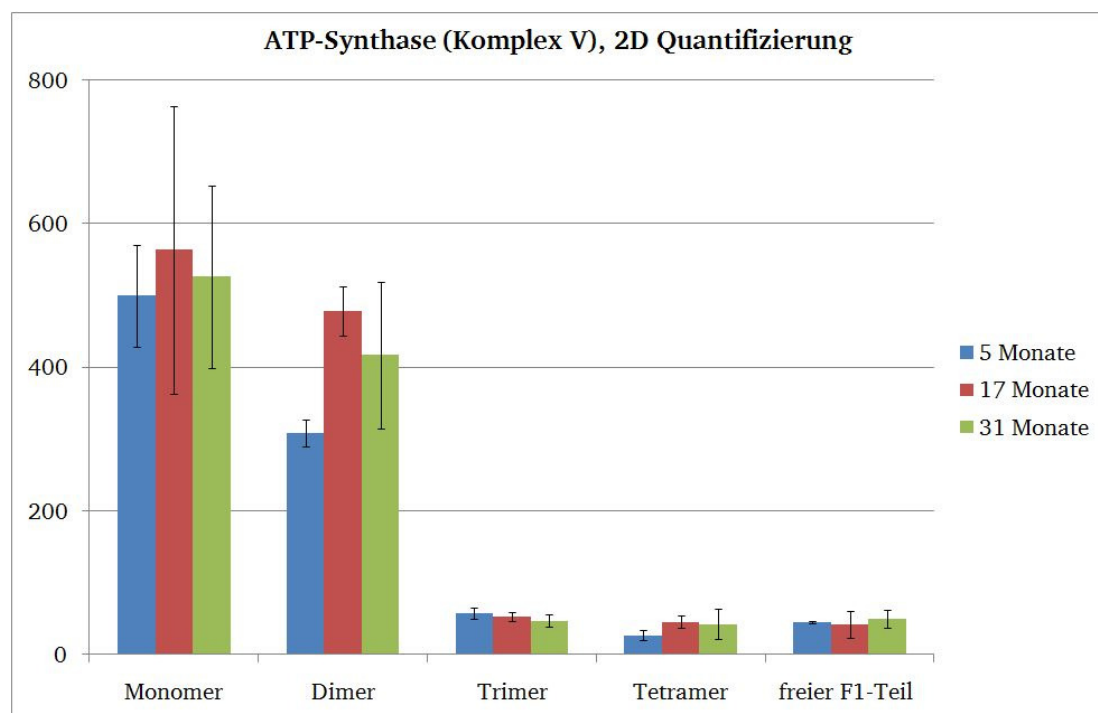
In Abbildung 5.22 wird gezeigt, dass die Komplexe I und IV in allen Altersstufen in etwa gleichen Mengen vorhanden sind. Dies steht im Widerspruch zu Daten von Frenzel et al. (2010), wo ein altersbedingter Rückgang von Komplex I um 60% beobachtet werden konnte, allerdings über eine 2D-BN/SDS-Quantifizierung und nur im Cortex-Anteil der Hirne. Die größten Fehler bestehen zwischen verschiedenen Tieren, nicht zwischen unterschiedlichen Messungen der Probe eines Tieres, was auf eine gute Reproduzierbarkeit hinweist.

Komplex III und die ATP-Synthase (V) allerdings kommen in den älteren Tieren in signifikant geringeren Mengen vor als in den jungen. Definiert man die Menge an

Komplex III bzw. an ATP-Synthase in 5 Monate alten Tieren als 100%, so liegen die Werte bei 17 monatigen Tieren für Komplex III und V jeweils bei 81%. In den sehr alten Tieren von 31 Monaten war die Menge an Komplex III sogar auf 61% und die der ATP-Synthase auf 58% abgesunken. Um festzustellen, wie die unterschiedlichen Mengen der individuellen Komplexe sich auf die verschiedenen Superkomplexe verteilen, werden die gleichen Proben mit Digitonin nativ solubilisiert und über BN-PAGE und zweidimensionale BN/SDS-PAGE aufgetrennt und quantifiziert.

Die quantitative Untersuchung der unterschiedlichen Atmungskettenkomplexe und -superkomplexe beinhaltet nur Ergebnisse von Tieren, deren Hirne 2006 und 2007 präpariert wurden. Alle 2005 von Reifschneider präparierten Proben enthielten nur noch geringe Mengen an intakten Superkomplexen und sind somit für diese Quantifizierung nicht geeignet.

Daraus folgt, dass sich in den Altersgruppen 17 Monate und 31 Monate nur noch zwei Tiere, in der Altersgruppe 5 Monate nur noch ein einziges Individuum untersuchen lässt, was wiederum bedeutet, dass die Ergebnisse höchstens Hinweise auf einen tatsächlichen Sachverhalt liefern, jedoch keine statistische Signifikanz besitzen.



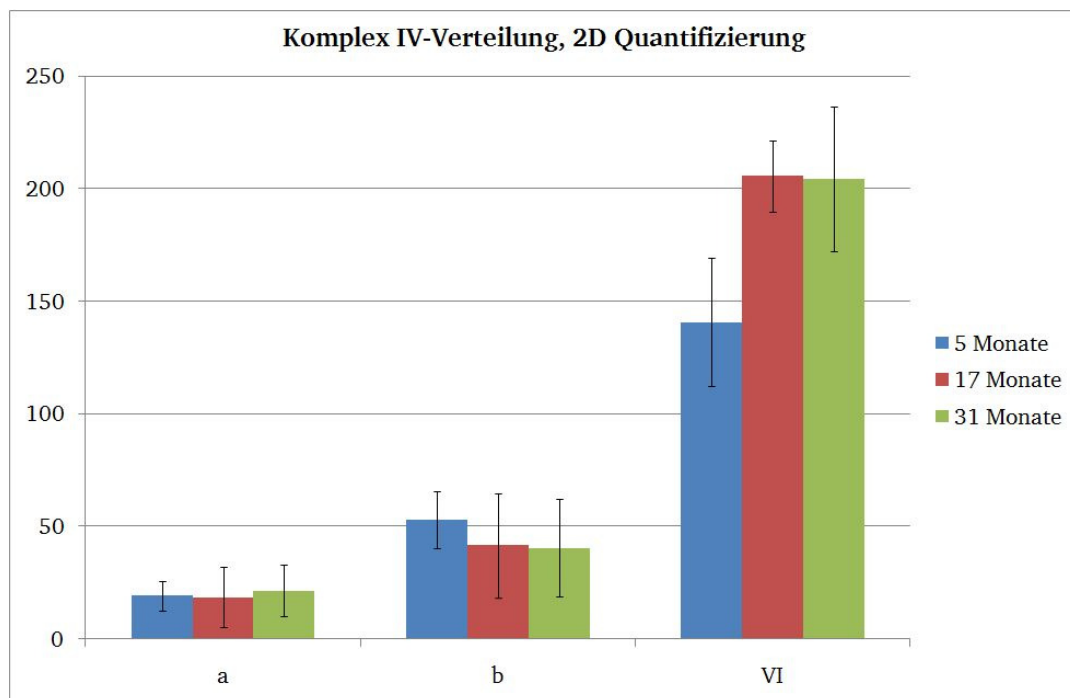
**Abbildung 5.23: Stöchiometrie der ATP-Synthase Superkomplexe in Rattenhirn in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.** Die Quantifizierung erfolgte über die Einzelquantifizierung der Proteinuntereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  der Komplexe und Superkomplexe nach 2D-BN/SDS-PAGE und Färbung mit Sypro<sup>®</sup> Ruby. Angabe in Graustufen-Werten nach Abzug des Hintergrundes.

---

Betrachtet man die Oligomerisierung von ATP-Synthasen in den verschiedenen Altersgruppen (Abbildung 5.23), so lassen sich aufgrund der hohen Standardabweichung der Messwerte für das Monomer keine Aussagen über eine altersbedingte Änderung treffen.

Trotz des relativ hohen Fehlers lässt sich aber sagen, dass die ATP-Synthase in allen Altersgruppen, wie bereits vermutet (siehe Kapitel 5.3.2), zum überwiegenden Teil und in vergleichbaren Anteilen als Monomer und als Dimer vorliegt. Nur ein geringer Anteil von etwa 5% entfällt jeweils auf Trimer, Tetramer und freien  $F_1$  Subkomplex. Bei den jungen Ratten scheint die isolierte Menge an ATP-Synthase Dimer geringer zu sein als bei den älteren Tieren von 17 und 31 Monaten.

Ein altersabhängiger Unterschied zeigt sich in den Interaktionen von Komplex IV. In Abbildung 5.24 wird die Menge an freiem Komplex IV mit Superkomplex a ( $I_1III_2$ ) und b ( $I_1III_2IV_1$ ) im 2D-Gel verglichen.



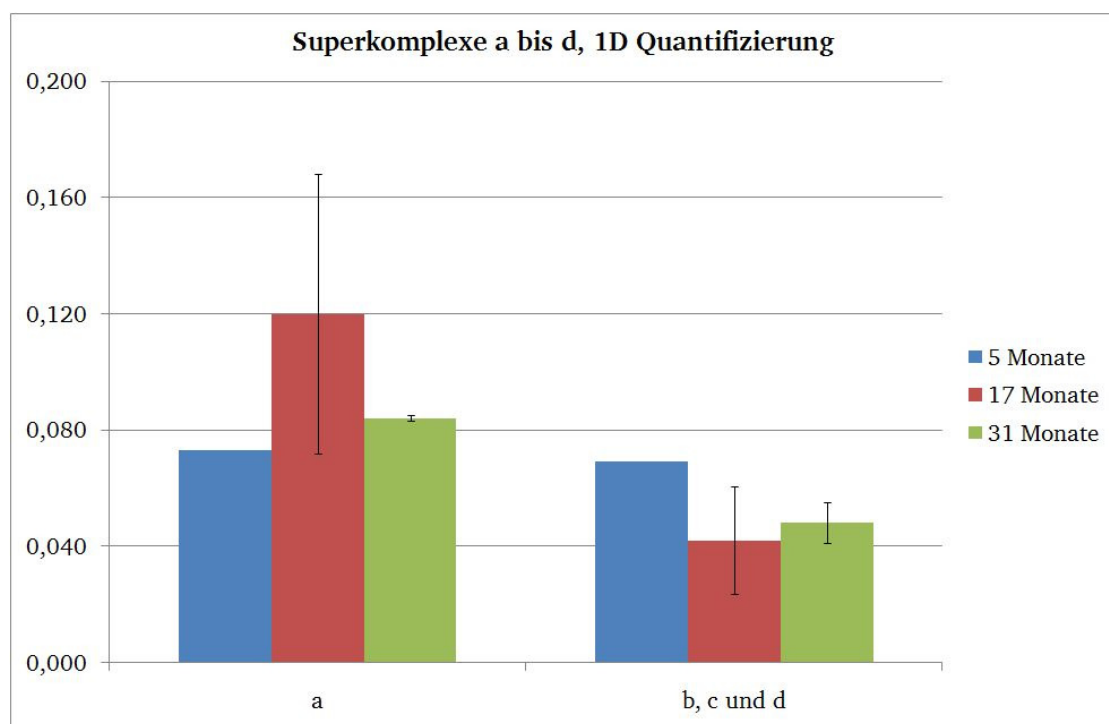
**Abbildung 5.24: Menge an freiem Komplex IV und Superkomplex a ( $I_1III_2$ ) und b ( $I_1III_2IV_1$ ) in Rattenhirnen verschiedener Altersgruppen.** Die Quantifizierung erfolgte über die Einzelquantifizierung der angefärbten Proteinuntereinheiten des Komplexes und der Superkomplexe nach 2D-BN/SDS-PAGE und Färbung mit Sypro<sup>®</sup> Ruby. In alten Tieren ist eine größere Menge an freiem Komplex IV zu sehen. Angaben in Graustufen-Werten nach Abzug des Hintergrundes.



---

Die Menge an Superkomplex b ist generell etwa doppelt so hoch wie die an Superkomplex a. Während jedoch die Werte für Superkomplex a in allen Altersgruppen ähnlichen sind, könnte Superkomplex b in den jungen Ratten in größerer Menge vorliegen. Die Messung des freien Komplex IV, der sich mehr in den älteren Tieren findet, könnte sich so erklären.

Betrachtet man die Quantifizierung der Superkomplexe a bis d im eindimensionalen, blau-nativen Gel (siehe Abbildung 5.25), so zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der 2D Quantifizierung: Superkomplex a ist in den 3 Altersgruppen in ähnlicher Menge vorhanden, in den älteren Tieren eher etwas mehr als in den jüngeren. Für die Summe aus den Superkomplexen b bis d gilt das Gegenteil: aus den jungen Ratten wird hier mehr Komplex-IV enthaltender Superkomplex gemessen als in den alten Ratten, was mit der Beobachtung aus der 2D-Quantifizierung übereinstimmt.



**Abbildung 5.25: Quantifizierung der Superkomplexe a bis d ( $I_1III_2IV_{0.3}$ ) aus Rattenhirnen verschiedener Altersgruppen.** Die Quantifizierung erfolgte über die densitometrische Messung der Superkomplexbanden nach 1D BN-PAGE und Färbung mit Coomassie R-250. Angaben in Graustufen-Werten nach Abzug des Hintergrundes.

---

### 5.3.4 Diskussion

Die Gesamtmenge einiger in der Mitochondrienmembran enthaltenen Atmungskettenkomplexe im Hirn von *Rattus norvegicus* wird durch das Altern beeinflusst. Während Komplex I und IV in den Mitochondrien von jungen wie von alten Tieren in konstanter Menge vorkommen, nimmt der Gehalt an Komplex III und V im Vergleich zur Gesamtproteinmenge mit dem Altern ab. 31 Monate alte Tiere besitzen, verglichen mit 5 Monate alten Tieren, nur noch etwa 60% dieser Komplexe. Diese Beobachtung bestätigt Ergebnisse, die für andere Rattenhirnproben aus dem Cortex vorliegen (Frenzel et al., 2010).

Die zur Quantifizierung genutzte eindimensionale SDS-PAGE mit anschließender Antikörpermarkierung hat sich in diesem Fall als nützliche Methode erwiesen. Zwar kommt es durch den Vorgang des Blottens immer wieder zu unregelmäßigen Färbungen, und es können nur Aussagen über die Gesamtmenge der individuellen Komplexe getroffen werden, jedoch lassen sich durch den relativ geringen Materialaufwand alle Experimente für jede Probe mehrfach wiederholen, so dass signifikante Unterschiede in den Proben erkannt werden.

Da für die Quantifizierungsexperimente der nativen Komplexe und Superkomplexe nur ein bis zwei Tiere pro Altersgruppe brauchbar waren, muss die Interpretation dieser Ergebnisse mit Vorsicht geschehen. Sowohl die 1D Quantifizierung der Gelbanden aus dem BN-Gel als auch die Quantifizierung von einzelnen Proteinuntereinheiten der entsprechenden Komplexe und Superkomplexe aus 2D-BN/SDS-Gelen zeigen, dass in jungen Tieren mehr Komplex b ( $I_1III_2IV_1$ ) zu finden ist. Des Weiteren zeigen die Analysen in alten Tieren mehr freien Komplex IV und mehr Superkomplex a ( $I_1III_2$ ), der keinen Komplex IV enthält. Geht man davon aus, dass die Solubilisierung mit 8 g Digitonin pro g Protein eine quantitative Ausbeute an Superkomplexen enthält ohne die Superkomplexe zu destabilisieren, und dass die Ergebnisse der Antikörperquantifizierung korrekt waren, dann liegt in älteren Tieren ein wesentlich geringerer Anteil an Komplex IV als Bestandteil der großen Superkomplexe vor.

Große Abweichungen lagen bei der Quantifizierung der Komplexe und Superkomplexe, anders als bei der Antikörpermarkierung, auch zwischen verschiedenen Messungen der gleichen Probe. Der methodische Fehler ist also bei der

---

2D Quantifizierung höher, außerdem kann er nicht auf den ersten Blick erkannt werden, wie bei einer unregelmäßigen Färbung des Blots bei einer Antikörpermarkierung (siehe Abbildung 5.21, Färbung der Untereinheit I aus Komplex IV). Es ist bei der Quantifizierung aus 2D Gelen unbedingt erforderlich, eine genügend große Menge an Tieren zu untersuchen, und die Gelanalyse jeder Probe mindestens einmal, besser mehrmals zu wiederholen. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Hirnproben, aus denen die Mitochondrien bereits gewonnen und eingefroren waren, kaum noch Atmungskettensuperkomplexe enthielten, während die eingefrorenen Hirnhälften, die von Tieren stammen, die zum gleichen Zeitpunkt getötet wurden, durchaus noch für eine Analyse geeignet sind. Die Atmungskettenkomplexe haben also die Lagerung im Gewebe besser überstanden als in den isolierten Mitochondrien (siehe auch: Schäfer, 2007).

Aus den Analysen ein oder zweidimensionaler Gele lässt sich aber auch bei einer ausreichenden Menge an Experimenten bzw. deren Wiederholung nicht zweifelsfrei folgern, ob die quantifizierten Superkomplexe in der nativen Membran wirklich in unterschiedlichen Mengen vorliegen, oder ob sie sich im Bezug auf ihre Stabilität unterscheiden, und während der Solubilisierung und der folgenden Analyse zu unterschiedlichen Anteilen zerfallen. Sämtliche Experimente werden außerdem auf eine konstante Proteinmenge vor der Solubilisierung normiert. Die Ergebnisse können also nicht auf eine bestimmte Zahl an Mitochondrien bezogen werden, da weder deren Anzahl noch Proteingehalt in den Ausgangsproben bekannt sind. Die Extraktion mit Digitonin könnte in jungen und alten Ratten aufgrund einer veränderten Membran-Zusammensetzung mit unterschiedlicher Effizienz erfolgen. Einen Einfluss auf die Stabilität der Superkomplexe könnten hier sowohl die sie umgebende Membran haben, als auch eventuell vorhandene posttranslationale Modifikationen oder altersbedingte Schäden an den Komplexen selbst, wie etwa Oxidationen durch ROS. Eine Analyse von altersabhängigen Modifikationen der Aminosäuresequenz sollte daher bei zukünftigen quantitativen Untersuchungen der Alterung an 2D-BN/SDS-Gelen ebenso durchgeführt werden wie eine Lipidanalyse der Mitochondrienmembran und eine Antikörperquantifizierung des Gesamtgehalts an individuellen Komplexen.

## 6 Abkürzungen

ABC	Ammoniumbicarbonat	HRP	Meerrettichperoxidase
ACN	Acetonitril	HS	High Salt
APS	Ammoniumperoxodisulfat	ICAT	Isotope Coded Affinity Tags
ATP	Adenosintriphosphat	iTRAQ	Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation
AUC	Area under curve, Flächenbereich unterhalb des Graphen	LC	Liquid Chromatography
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan	LMW	Low molecular weight
BN	Blau-Nativ	LP	Long Pass
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)	MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
BT	Bis-Tris	MF <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	Mitochondriale ATP-Synthase Komplex Monomer
C	Vernetzungsgrad im PA Gel	(MF <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ) <sub>2</sub>	Mitochondriale ATP-Synthase Komplex Dimer
CF <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	Chloroplasten-ATP-Synthase Komplex Monomer	MS	Massenspektrometrie
(CF <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ) <sub>2</sub>	Chloroplasten-ATP-Synthase Komplex Dimer	MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology
CN	Colourless native	Na <sub>2</sub> EDTA	Ethylendiaminotetraacetat(-dinatriumsalz)
CRM	Charged Residue Model	NADH	Nicotin-Adenin-Dinucleotid
DAB	3,3' Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	NBT	4-Nitro-Blau-Tetrazolium-chlorid
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltopyranosid	PA	Polyacrylamid
DHB	Dihydroxybenzoesäure	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DIGE	Differential In Gel Electrophoresis	PBS	Phosphat-Puffer-Lösung
DTT	Dithiothreitol	PBST	Phosphat-Puffer-Lösung mit Tween
ESI	Electrospray Ionisation	PMF	Peptide Mass Fingerprinting
FA	Ferularsäure	PVDF	Polyvinylidenfluorid
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure	Q	Ubichinon, Coenzym Q
HEPES	Hydroxypiperazidinesulfonsäure	ROS	Reactive oxygen species
HMW	High molecular weight	RP	Reversed Phase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	RT	Raumtemperatur
		SA	Sinapinsäure
		SDS	Natriumdodecylsulfat

---

T	Totalacrylamidkonzentration	Tricin	(N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-
TAP	Tris-Acetat-Phosphat		glycin)
TBS	Tris-Puffer-Lösung	TRIS	(Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TCA	Trichloressigsäure	Trp	Tryptophan
TEMED	Tetramethylethyldiamin	TTBS	Tris-Puffer-Lösung mit Tween
TFA	Trifluoressigsäure	UE	Untereinheit
TOF	Time of flight	$\beta$ -NADH	Reduzierte Form des Nicotinamid- Adenin-Dinucleotid

---

## 7 Literatur

- Albrecht, S., H. Brandl and W. Adam (1990). "Chemilumineszenz-Reaktionen." *Chemie in unserer Zeit* **5**: 227-238.
- Allen, R. D., C. C. Schroeder and A. K. Fok (1989). "An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques." *J Cell Biol* **108**: 2233-40.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen (1995). "Mitochondrial decay in aging." *Biochim Biophys Acta* **1271**: 165-70.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart and H. Schagger (1998a). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." *EMBO J* **17**: 7170-8.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart and H. Schagger (1998b). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." *EMBO J* **17**: 7170-8.
- Beavis, R. C. and B. T. Chait (1989). "Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins." *Rapid Commun Mass Spectrom* **3**: 432-5.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2007). *Biochemie*. München, Elsevier.
- Berggren, K., E. Chernokalskaya, T. H. Steinberg, C. Kemper, M. F. Lopez, Z. Diwu, R. P. Haugland and W. F. Patton (2000). "Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex." *Electrophoresis* **21**: 2509-21.
- Blum, H., H. Beier and H. J. Gross (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Braun, R. J., N. Kinkl, M. Beer and M. Ueffing (2007). "Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins." *Anal Bioanal Chem* **389**: 1033-45.

- 
- Chance, B. and G. R. Williams (1955). "A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation." *Nature* **176**: 250-4.
- Conrads, T. P., K. Alving, T. D. Veenstra, M. E. Belov, G. A. Anderson, D. J. Anderson, M. S. Lipton, L. Pasa-Tolic, H. R. Udseth, W. B. Chrisler, B. D. Thrall and R. D. Smith (2001). "Quantitative analysis of bacterial and mammalian proteomes using a combination of cysteine affinity tags and <sup>15</sup>N-metabolic labeling." *Anal Chem* **73**: 2132-9.
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. New York, W H Freeman & Co.
- Dani, D. and N. A. Dencher (2008). "Native-DIGE: a new look at the mitochondrial membrane proteome." *Biotechnol J* **3**: 817-22.
- Devenish, R. J., M. Prescott and A. J. Rodgers (2008). "The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases." *Int Rev Cell Mol Biol* **267**: 1-58.
- Dole, M., L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice (1968). "Molecular beams of macroions." *J Chem Phys* **49**: 2240-2249.
- Dudkina, N. V., J. Heinemeyer, W. Keegstra, E. J. Boekema and H. P. Braun (2005). "Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane." *FEBS Lett* **579**: 5769-72.
- Dudkina, N. V., J. Heinemeyer, S. Sunderhaus, E. J. Boekema and H. P. Braun (2006). "Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane." *Trends Plant Sci* **11**: 232-40.
- Duffy, V. E., P. A. Stockwell, D. M. Warrington and B. C. Monk (1989). "Laser excitation of fluorescent-labeled polypeptides in polyacrylamide gels." *Anal Biochem* **179**: 291-8.
- Edelstein, S. J. (1980). "Patterns in the quinary structures of proteins. Plasticity and inequivalence of individual molecules in helical arrays of sickle cell hemoglobin and tubulin." *Biophys J* **32**: 347-60.
- Erikson, M., P. Garderström and G. Samuelsson (1995). "Isolation, purification and characterisation of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiol* **133**: 274-286.
- Eubel, H., J. Heinemeyer and H. P. Braun (2004a). "Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria." *Plant Physiol* **134**: 1450-9.
- Eubel, H., J. Heinemeyer, S. Sunderhaus and H. P. Braun (2004b). "Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria." *Plant Physiol Biochem* **42**: 937-42.
-

- 
- Eubel, H., L. Jansch and H. P. Braun (2003). "New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II." *Plant Physiol* **133**: 274-86.
- Ferguson, R. E., H. P. Carroll, A. Harris, E. R. Maher, P. J. Selby and R. E. Banks (2005). "Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies." *Proteomics* **5**: 566-71.
- Fernandez-Patron, C., L. Castellanos-Serra and P. Rodriguez (1992). "Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins." *Biotechniques* **12**: 564-73.
- Ffrench-Constant, C. and G. A. Mathews (1994). "Brain repair: lessons from developmental biology." *J Neurol* **242**: S29-32.
- Fiedler, H. R., R. Schmid, S. Leu, N. Shavit and H. Strotmann (1995). "Isolation of CF0CF1 from *Chlamydomonas reinhardtii* cw15 and the N-terminal amino acid sequences of the CF0CF1 subunits." *FEBS Lett* **377**: 163-6.
- Frasch, A. C., C. R. Deluca, M. J. Kulzick and B. R. Selman (1980). "A quantitative estimation of chloroplast thylakoid-bound coupling factor 1 by rocket immunoelectrophoresis." *FEBS Lett* **122**: 125-128.
- Frenzel, M. A. (2007). Altersabhängige Untersuchung des Proteoms von *Rattus norvegicus*. Physikalische Biochemie, TU Darmstadt. **Diplomarbeit**.
- Frenzel, M. A., H. Rommelspacher, M. Sugawa and N. A. Dencher (2010). "Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex." *Experimental Gerontology*.
- Gavin, P. D., M. Prescott and R. J. Devenish (2005). "F1F0-ATP synthase complex interactions in vivo can occur in the absence of the dimer specific subunit e." *J Bioenerg Biomembr* **37**: 55-66.
- Gavin, P. D., M. Prescott, S. E. Luff and R. J. Devenish (2004). "Cross-linking ATP synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae." *J Cell Sci* **117**: 2333-2343.
- Gharahdaghi, F., C. R. Weinberg, D. A. Meagher, B. S. Imai and S. M. Mische (1999). "Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity." *Electrophoresis* **20**: 601-5.
- Gilkerson, R. W., J. M. Selker and R. A. Capaldi (2003). "The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation." *FEBS Lett* **546**: 355-358.



- 
- Giraud, M. F., P. Paumard, V. Soubannier, J. Vaillier, G. Arselin, B. Salin, J. Schaeffer, D. Brethes, J. P. di Rago and J. Velours (2002). "Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?" *Biochim Biophys Acta* **1555**: 174-80.
- Görg, A., W. Postel and R. Westermeier (1978). "Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane." *Anal Biochem* **89**: 60-70.
- Grandier-Vazeille, X. and M. Guerin (1996). "Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes." *Anal Biochem* **242**: 248-54.
- Gromova, I. and J. E. Celis (2006). *Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry Cell Biology: A Laboratory Handbook*. J. E. Celis, C. N., H. T. et al, Elsevier; Academic Press.
- Hackenbrock, C. R., B. Chazotte and S. S. Gupte (1986). "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport." *J Bioenerg Biomembr* **18**: 331-68.
- Harlow, E. and D. Lane (1988). *Antibodies: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Publications.
- Harris, E. H. (1989). *The Chlamydomonas sourcebook*. New York.
- Juhasz, P. and C. E. Costello (1993). "Generation of large radical ions from oligometalloenes by matrix-assisted laser desorption ionization." *Rapid Commun Mass Spectrom* **7**: 343-51.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal Chem* **60**: 2299-301.
- Kebarle, P. and U. H. Verkerk (2009). "Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now." *Mass Spectrom Rev* **28**: 898-917.
- Kirley, T. L. (1989). "Reduction and fluorescent labeling of cyst(e)ine-containing proteins for subsequent structural analyses." *Anal Biochem* **180**: 231-6.
- Koletzko, B., T. Sauerwald and H. Demmelmair (1997). "Safety of stable isotope use." *Eur J Pediatr* **156 Suppl 1**: S12-7.
- Krause, F. (2006). "Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes." *Electrophoresis* **27**: 2759-81.

- 
- Krause, F., N. H. Reifschneider, S. Goto and N. A. Dencher (2005). "Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria." *Biochem Biophys Res Commun* **329**: 583-90.
- Krause, F., N. H. Reifschneider, D. Vocke, H. Seelert, S. Rexroth and N. A. Dencher (2004a). "'Respirasome'-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach." *J Biol Chem* **279**: 48369-75.
- Krause, F., C. Q. Scheckhuber, A. Werner, S. Rexroth, N. H. Reifschneider, N. A. Dencher and H. D. Osiewacz (2004b). "Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*." *J Biol Chem* **279**: 26453-61.
- Krause, F., C. Q. Scheckhuber, A. Werner, S. Rexroth, N. H. Reifschneider, N. A. Dencher and H. D. Osiewacz (2006). "OXPHOS Supercomplexes: respiration and life-span control in the aging model *Podospora anserina*." *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 106-15.
- Krijgsveld, J., R. F. Ketting, T. Mahmoudi, J. Johansen, M. Artal-Sanz, C. P. Verrijzer, R. H. Plasterk and A. J. Heck (2003). "Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics." *Nat Biotechnol* **21**: 927-31.
- Kussmann, M., U. Lassing, C. A. Sturmer, M. Przybylski and P. Roepstorff (1997). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping of the neural cell adhesion protein neurolin purified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or acidic precipitation." *J Mass Spectrom* **32**: 483-93.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-5.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**: 265-75.
- Mann, M. and G. Talbo (1996). "Developments in matrix-assisted laser desorption/ionization peptide mass spectrometry." *Curr Opin Biotechnol* **7**: 11-9.
- Marques, I., N. A. Dencher, A. Videira and F. Krause (2007). "Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria." *Eukaryot Cell* **6**: 2391-405.

- 
- Meyer zu Tittingdorf, J. M. (2004). Isolierung, Charakterisierung und Kristallisation der Chloroplasten-ATP-Synthase und des Subkomplexes CF<sub>o</sub>. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Dissertation**.
- Meyer zu Tittingdorf, J. M., S. Rexroth, E. Schafer, R. Schlichting, C. Giersch, N. A. Dencher and H. Seelert (2004). "The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state." *Biochim Biophys Acta* **1659**: 92-9.
- Millar, A. H., V. Mittova, G. Kiddle, J. L. Heazlewood, C. G. Bartoli, F. L. Theodoulou and C. H. Foyer (2003). "Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses." *Plant Physiol* **133**: 443-7.
- Minauro-Sanmiguel, F., S. Wilkens and J. J. Garcia (2005). "Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F<sub>0</sub> bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12356-8.
- Moore, W. T. (1997). "Laser desorption mass spectrometry." *Methods Enzymol* **289**: 520-42.
- Neff, D. and N. A. Dencher (1999). "Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF<sub>1</sub>-ATP synthase, CF<sub>o</sub> and CF<sub>1</sub> by blue native electrophoresis." *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 569-75.
- Oda, Y., K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn and B. T. Chait (1999). "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6591-6.
- Paumard, P., J. Vaillier, B. Coulary, J. Schaeffer, V. Soubannier, D. M. Mueller, D. Brethes, J. P. di Rago and J. Velours (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." *EMBO J* **21**: 221-30.
- Pellerin, L., G. Bonvento, J. Y. Chatton, K. Pierre and P. J. Magistretti (2002). "Role of neuron-glia interaction in the regulation of brain glucose utilization." *Diabetes Nutr Metab* **15**: 268-73; discussion 273.
- Pfeiffer, K., V. Gohil, R. A. Stuart, C. Hunte, U. Brandt, M. L. Greenberg and H. Schagger (2003). "Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem* **278**: 52873-80.
- Rabilloud, T., G. Carpentier and P. Tarroux (1988). "Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite." *Electrophoresis* **9**: 288-91.
- Rabilloud, T., J. M. Strub, S. Luche, J. L. Girardet, A. Van Dorsselaer and J. Lunardi (2000). "Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate), a powerful fluorescent stain for detection of proteins in gel with minimal interference in subsequent mass spectrometry analysis." *Proteome*.
-

- 
- Rabilloud, T., J. M. Strub, S. Luche, A. van Dorsselaer and J. Lunardi (2001). "A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels." *Proteomics* **1**: 699-704.
- Rabilloud, T., A. R. Vaezzadeh, N. Potier, C. Lelong, E. Leize-Wagner and M. Chevallet (2009). "Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies." *Mass Spectrom Rev* **28**: 816-43.
- Reifschneider, N. H. (2006). Elektrophoretische und massenspektrometrische Analyse des mitochondrialen Proteoms von Eukaryoten. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Dissertation**.
- Reifschneider, N. H., S. Goto, H. Nakamoto, R. Takahashi, M. Sugawa, N. A. Dencher and F. Krause (2006). "Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE." *J Proteome Res* **5**: 1117-32.
- Renart, J., J. Reiser and G. R. Stark (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 3116-20.
- Rexroth, S. (2004). Struktur und Dynamik der Thylakoidmembran. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Dissertation**.
- Rexroth, S., J. M. Meyer zu Tittingdorf, F. Krause, N. A. Dencher and H. Seelert (2003). "Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome." *Electrophoresis* **24**: 2814-23.
- Rexroth, S., J. M. Meyer Zu Tittingdorf, H. J. Schwassmann, F. Krause, H. Seelert and N. A. Dencher (2004). "Dimeric H<sup>+</sup>-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochim Biophys Acta* **1658**: 202-11.
- Saraste, M., T. Penttilä and M. Wikström (1981). "Quaternary structure of bovine cytochrome oxidase." *Eur J Biochem* **115**: 261-8.
- Schäfer, E. (2006). Biochemische und strukturelle Untersuchungen von Superkomplexen der Atmungskette und von F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthasen. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Dissertation**.
- Schäfer, E., N. A. Dencher, J. Vonck and D. N. Parcej (2007). "Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria." *Biochemistry* **46**: 12579-85.

- 
- Schäfer, E., H. Seelert, N. H. Reifschneider, F. Krause, N. A. Dencher and J. Vonck (2006). "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem* **281**: 15370-5.
- Schäfer, E. R. (2005). Mitochondriale Superkomplexe aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Physikalische Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Praktikumsprotokoll**.
- Schäfer, E. R. (2007). Vergleich des mitochondrialen Rattenhirnproteoms verschiedener Alterstufen mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI-Massenspektrometrie. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Diplomarbeit**.
- Schägger, H. (2001). "Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria." *Methods Cell Biol* **65**: 231-44.
- Schägger, H. (2002). "Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria." *Biochim Biophys Acta* **1555**: 154-9.
- Schägger, H., W. A. Cramer and G. von Jagow (1994). "Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis." *Anal Biochem* **217**: 220-30.
- Schägger, H. and K. Pfeiffer (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." *EMBO J* **19**: 1777-83.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." *Anal Biochem* **199**: 223-31.
- Schicht, O. (2003). Protein-Protein Wechselwirkungen des mitochondrialen Proteoms von Vertebraten. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Diplomarbeit**.
- Schilling, B., M. M. S. Bharath, R. H. Row, J. Murray, M. P. Cusack, R. A. Capaldi, C. R. Freed, K. N. Prasad, J. K. Andersen and B. W. Gibson (2005). "Rapid purification and mass spectrometric characterization of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I) from rodent brain and a dopaminergic neuronal cell line." *Mol Cell Proteomics* **4**: 84-96.
- Schmelz, S. (2006). Chromatographische und massenspektrometrische Analysen von hydrophilen Proteinen am Beispiel der Chloroplasten-ATP-Synthase. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Diplomarbeit**.
- Schrattenholz, A. (2001). Methoden der Proteomforschung. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
-

- 
- Schwassmann, H. J. (2004). Untersuchung des Proteoms von Chloroplasten und Mitochondrien der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* mittels mehrdimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-Massenspektrometrie. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Diplomarbeit.**
- Schwassmann, H. J., S. Rexroth, H. Seelert and N. A. Dencher (2007). "Metabolism controls dimerization of the chloroplast FoF1 ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*." FEBS Lett **581**: 1391-6.
- Seelert, H. (2000). Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Dissertation.**
- Seelert, H. and F. Krause (2008). "Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels." Electrophoresis **29**: 2617-36.
- Seelert, H., A. Poetsch, M. Rohlf and N. A. Dencher (2000). "Dye-ligand chromatographic purification of intact multisubunit membrane protein complexes: application to the chloroplast H<sup>+</sup>-FoF1-ATP synthase." Biochem J **346 Pt 1**: 41-4.
- Sharkey, T. D. and P. J. Vanderveer (1989). "Stromal Phosphate Concentration Is Low during Feedback Limited Photosynthesis." Plant Physiol **91**: 679-684.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm and M. Mann (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." Anal Chem **68**: 850-8.
- Smith, D. P. H. (1986). "The electrohydrodynamic atomization of liquids." IEEE Trans Ind Appl **22**: 527-535.
- Suhai, T. (2008a). Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthasen aus Cyanobakterien und Grünalgen. Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Dissertation.**
- Suhai, T. (2008b). Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthasen aus Cyanobakterien und Grünalgen. Physikalische Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Dissertation.**
- Sun, G., M. T. Kinter and V. E. Anderson (2003). "Mass spectrometric characterization of mitochondrial electron transport complexes: subunits of the rat heart ubiquinol-cytochrome c reductase." J Mass Spectrom **38**: 531-9.
- Thilmany, S. (2008). Effekte des Alterns und der kurzzeitigen Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom der Rattenleber. Physikalische Biochemie. Darmstadt, TU Darmstadt. **Diplomarbeit.**
-

- 
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4.
- Tweedie-Cullen, R. Y. and M. Livingstone-Zatchej (2009). "Quantitative analysis of protein expression using iTRAQ and mass spectrometry." *Nature Protocols*.
- van Lis, R., A. Atteia, G. Mendoza-Hernandez and D. Gonzalez-Halphen (2003). "Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach." *Plant Physiol* **132**: 318-30.
- Vazquez-Acevedo, M., P. Cardol, A. Cano-Estrada, M. Lapaille, C. Remacle and D. Gonzalez-Halphen (2006). "The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex." *J Bioenerg Biomembr* **38**: 271-82.
- Velot, C., M. B. Mixon, M. Teige and P. A. Srere (1997). "Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon." *Biochemistry* **36**: 14271-6.
- Voet, D. J. and J. G. Voet (2004). *Biochemistry*. Hoboken, Wiley.
- Voet, D. J., J. G. Voet and C. W. Pratt (2002). *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH.
- Vonck, J. and E. Schäfer (2009). "Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane." *Biochim Biophys Acta* **1793**: 117-24.
- Wagner, K., P. Rehling, L. K. Sanjuan Szklarz, R. D. Taylor, N. Pfanner and M. van der Laan (2009). "Mitochondrial F1Fo-ATP synthase: the small subunits e and g associate with monomeric complexes to trigger dimerization." *J Mol Biol* **392**: 855-61.
- Wilm, M. and M. Mann (1994). "Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's beam of macromolecules at last?" *Int J Mass Spectrom Ion Proc* **136**: 167-180.
- Wilm, M. and M. Mann (1996). "Analytical properties of the nanoelectrospray ion source." *Anal Chem* **68**: 1-8.
- Winger, B. A., K. J. Light-Wahl, O. L. R. R., H. R. Udseth and R. D. Smith (1993). "Observations and implications of high mass-to-charge ratio ions from electrospray ionization mass spectrometry." *J Am Soc Mass Spectrom* **4**: 536-545.
- Wittig, I., M. Karas and H. Schagger (2007). "High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes." *Mol Cell Proteomics* **6**: 1215-25.
-

- 
- Wu, C. C., M. J. MacCoss, K. E. Howell, D. E. Matthews and J. R. Yates, 3rd (2004). "Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis." *Anal Chem* **76**: 4951-9.
- Yonan, C. R., P. T. Duong and F. N. Chang (2005). "High-efficiency staining of proteins on different blot membranes." *Anal Biochem* **338**: 159-61.
- Zerbetto, E., L. Vergani and F. Dabbeni-Sala (1997). "Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **18**: 2059-64.
- Zor, T. and Z. Selinger (1996). "Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies." *Anal Biochem* **236**: 302-8.



---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Helena Schwaßmann, geb. Krystek
Adresse	Parkstraße 75 64289 Darmstadt
Geburtstag	28. 02. 1979
Geburtsort	Hilden
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

### Schulbildung

1985 bis 1989	katholische Grundschule St. Suitbertus, Heiligenhaus
1989 bis 1995	Immanuel-Kant-Gymnasium, Heiligenhaus
1995 bis 1996	Stipendium des Rotary Clubs, Jamesville-DeWitt Highschool, DeWitt, New York, USA
1996 bis 1998	Immanuel-Kant-Gymnasium, Heiligenhaus, Abitur

### Hochschulbildung

1998 bis 2003	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität zu Köln
2003 bis 2004	Externe Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. A. Dencher an der TU Darmstadt: „Untersuchung des Proteoms von Chloroplasten und Mitochondrien der Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mittels mehrdimensionaler Gelelektrophorese und MALDI- Massenspektrometrie“
2004 bis 2007	Promotion an der TU Darmstadt
2007 bis 2008	Elternzeit
2008 bis 2010	Promotion an der TU Darmstadt, Dissertation: „Analyse von Atmungskettenkomplexen aus Organellen von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und <i>Rattus norvegicus</i> “

---

---

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Darmstadt den 19.2.2010

.....  
(Helena Schwaßmann)

---